

1969

**EINFLUSS VON TESTOSTERON AUF DIE
KONZENTRATION VON THYMINDERIVATEN ALS
BAUSTEINE DER DNA IN EINIGEN ORGANEN
UNREIFER MÄNNLICHER RATTEN**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von
WOLFGANG HENGSTEBECK
aus
OLPE

BONN 1969

EINFLUSS VON TESTOSTERON AUF DIE
KONZENTRATION VON THYMINDERIVATEN ALS
BAUSTEINE DER DNA IN EINIGEN ORGANEN
UNREIFER MÄNNLICHER RATTEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von
WOLFGANG HENGSTEBECK

aus
OLPE

BONN 1969

Angefertigt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Bonn

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Karl-Oskar Mosebach

Korreferent: Prof. Dr. med. Dr.-Ing. Wilhelm Dirscherl

Tag der mündlichen Prüfung: 21. März 1969

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der
Universität Bonn

Direktor: Prof. Dr. Dr. W. Dirscherl

Druck: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität
B o n n

Meiner Mutter gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsübersicht

	<u>Seite</u>
Einführung	7
Theoretischer Teil	8
a) Theorien über die Wirkungsweise von Hormonen	8
1. Enzymaktivierung	8
2. Änderung der Membranpermeabilität	10
3. Genaktivierung	11
b) Wirkungen von Steroidhormonen (Androgene, ver- gleichsweise Östrogene und Corticosteroide)	13
1. Förderung der Proteinsynthese	13
2. Förderung der RNA-Synthese	14
3. Förderung der DNA-Synthese	16
4. Einfluß auf RNA-Bausteinkonzentrationen	17
c) Transport des Testosteron im Plasma und seine Bindung in der Zelle	17
d) Problemstellung und Begründung der Versuchs- anordnung	18
Experimenteller Teil	20
I. Methodik	20
a) Tiere und Injektionen	20
1. Tiermaterial	20
2. Testosteronvorbehandlung	20
3. Thymidininjektion	21
b) Aufarbeitung der Organe und Reinigung der Ex- trakte	21
1. Organentnahme	21
2. Gewebezerkleinerung	22
3. Extraktion	23
4. Reinigung der Extrakte über Aktivkohle	24
5. Nukleinsäureextraktion	26
6. Zellfraktionierung	27
7. Anhang: Nukleinsäure-Eichkurven	28

c) Chromatographische Trennung von Thymin, Thymidin und seinen Nukleotiden	33
1. Dünnschichtchromatographie	33
2. Papierchromatographie	37
d) Radioaktivitätsbestimmungen	39
1. Radiodünnschichtchromatograph	39
2. Radiopapierchromatograph	40
3. Radioaktivitätsbestimmung im Flüssig-Szintillations-Spektrometer	41
4. SCHÖNIGER-Verbrennung	42
5. Bestimmung der Radioaktivität in der Gasphase (SIMON)	43

II. Ergebnisse	46
a) Einfluß von Testosteron auf die Radioaktivität der Bausteine im Blut	46
b) Einfluß von Testosteron auf die Radioaktivität der Bausteine in Leber und Nieren	48
c) Einfluß von Testosteron auf die Radioaktivität der Bausteine in den Vesikulardrüsen	50
d) Versuche zur Differenzierung der Bausteinzusammensetzung	51
e) Analyse der hydrolysierten Bausteine	52
f) Vergleich der Radioaktivitätsmengen in säurelöslicher Fraktion und in Proteinbindung	55
1. Leber	55
2. Nieren	56
3. Vesikulardrüsen	56
g) Relationen zwischen säurelöslicher, DNA-gebundener und proteingebundener Radioaktivität	58
h) Vergleich der nicht an Nukleinsäuren gebundenen Radioaktivitäten	60

III. Diskussion	62
Zusammenfassung	69
Literatur	71
Abkürzungsverzeichnis	75

Einführung

Der Wirkungsmechanismus von Hormonen im Säugetierorganismus ist noch in keinem Falle aufgeklärt worden. Auch im physiologisch-chemischen Institut in Bonn wird seit Jahren an diesem Problem gearbeitet. Als Hormon wird hierbei Testosteron eingesetzt, weil es für dieses Hormon relativ ausgeprägte Erfolgsorgane gibt. Da zur Zeit die Theorie von KARLSON (1965, KARLSON und SEKERIS 1966 a) über Hormonwirkungen als Genaktivierungen am besten fundiert ist, wurde an unserem Institut auch der in vivo-Einfluß von Testosteron auf den RNA- und DNA-Stoffwechsel in Erfolgsorganen studiert. (MOSEBACH und ENGELS 1966, MOSEBACH et al. 1967 a). Hierbei wurde ein auffallender Einfluß auf den Einbau von ^{14}C -Thymidin in die DNA der Vesikulardrüsen entdeckt (MOSEBACH und ENGELS 1966). Da ein solcher Effekt entweder auf eine Erhöhung der Bausteinkonzentrationen oder auf eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der unmittelbar an der DNA-Synthese beteiligten Reaktionen zurückzuführen ist, war es zunächst einmal erforderlich, den Einfluß von Testosteron auf die Bausteinkonzentration kennenzulernen. Wir hofften durch eine solche Untersuchung Anhaltspunkte darüber zu erhalten, ob Testosteron in erster Linie die Permeabilität der Zellmembran in Vesikulardrüsen steigert oder die Aktivität der an der DNA-Synthese unmittelbar beteiligten Enzyme im Kern. Im ersten Fall wäre eher eine Erhöhung, im zweiten Fall eine Erniedrigung der Bausteinkonzentration zu erwarten.

Theoretischer Teil

a) Theorien über die Wirkungsweise von Hormonen

Schon in den 50er Jahren erschienen die ersten Arbeiten über mögliche Wirkungsmechanismen von Steroidhormonen (u.a. DIRSCHERL 1954, 1955a, 1955b). In der Folge kristallisierten sich im wesentlichen 3 Theorien über die Wirkungsweise von Hormonen heraus:

1. Beeinflussung von Enzymaktivitäten
2. Permeabilitätsveränderungen an peri- und intrazellulären Membranen
3. Genaktivierung und Enzyminduktion

Diese 3 Theorien seien im folgenden kurz vorgestellt und erläutert.

1. Enzymaktivierung

Die Untersuchung der ersten Wirkungsmöglichkeit erfolgt ausschließlich durch in vitro-Versuche, da bei in vivo-Versuchen eine Abgrenzung gegen die beiden anderen Möglichkeiten sehr schwierig ist. Derartige Untersuchungen sind in der Literatur bei TSH, ACTH, FSH, HCG, Adrenalin und Glucagon, Thyroxin, Insulin und auch bei Steroidhormonen bekannt (BREUER 1965).

So steigert TSH (PASTAN et al. 1961) ebenso wie Adrenalin (PASTAN et al. 1962) die Glucoseoxydation im Schilddrüsengewebe durch Erhöhung der NADP-Konzentration. Eine Zunahme der Glycogenphosphorylaseaktivität über eine vermehrte Bildung von 3',5'-AMP erhielten HAYNES et al. (1960) sowohl nach Inkubation von Nebennierenschnitten des Rindes mit ACTH als auch durch Adrenalin und Glucagon in Leberhomogenaten.

Gonadotrope Hormone stimulieren auch in vitro die Steroidbiosynthese (ICHII et al. 1963). Nach MARSH et al. (1966) geht dem Anstieg der Progesteron-Synthese eine schnelle Anreicherung von 3',5'-AMP bis zum 100fachen der Ausgangskonzentration voran. Er sieht 3',5'-AMP als Media-

tor an, da es, exogen zugesetzt, die Steroidbiosynthese ebenfalls stimuliert (MARSH und SAVARD 1966). So erhielten auch SANDLER und HALL (1968) durch 3',5'-AMP eine Steigerung der Testosteronsynthese im Rattenhoden.

Adrenalin stimuliert in Gewebekulturen der fetalen Rattenleber, ebenso wie Dibutyryl-3',5'-AMP, die Aktivität der Tyrosin- α -Ketoglutarat-Transaminase (WICKS 1968). Die Stimulation dieser Transaminase ist auch durch Insulin und Glucagon bekannt, Hydrocortison wirkt über einen anderen Mechanismus gleichsinnig (HOLTEN und KENNEY 1967). LANG et al. (1968) wiesen die Steigerung dieser Fermentaktivität durch eine RNA-Fraktion aus der Leber cortisolbehandelter Ratten in einem proteinsynthetisierenden System nach und zeigten, daß sie von einer *de novo*-Proteinsynthese abhängig ist.

Eine der ersten Untersuchungen über die Wirkung von Steroidhormonen auf Enzymsysteme wurde von DIRSCHERL 1949 durchgeführt. In der Folge zeigten ENGEL und SCOTT (1960) die Aktivierung der Glutamatdehydrogenase aus Rinderleber durch Corticosteron. 11-Epicorticosteron und Testosteron sind in dieser Versuchsanordnung wirkungslos. Nach KNOX und AUERBACH (1955) steigert Cortison die Tryptophanperoxydaseaktivität der Rattenleber. Östrogene aktivieren nach TALALAY (1958) die lösliche Transhydrogenase der Placenta. Kristallisierte Glutamatdehydrogenase aus Rinderleber wird durch Diäthylstilböstrol, Östradiol und Progesteron, nicht aber durch Cortison gehemmt. Diese Hemmung erfolgt laut YIELDING und TOMKINS (1960) durch Dissoziation der GDH in Untereinheiten und ist durch ADP zu verhindern. In Prostata-Gewebekulturen kastrierter Ratten führte Testosteron in Gegenwart von Glucose zum Anstieg der NADH-Konzentration (RITTER und PADDLE 1967).

Diese *in vitro*-Systeme weichen jedoch häufig von den physiologischen Gegebenheiten in der Zelle ab, so daß die Wirkungen *in vitro* nicht ohne weiteres auf die Vorgänge *in vivo* übertragbar sind (BREUER 1965). Darüber hinaus können viele der beobachteten Effekte auch durch Zusatz von nicht hormonähnlichen Substanzen ausgelöst werden. Manche Autoren sehen deshalb die Effekte *in vitro* sogar als Artefakte an (KARLSON 1965).

2. Änderung der Membranpermeabilität

Dieser Theorie liegt die Vorstellung zugrunde, daß Hormone in den Zellmembranen Veränderungen im Sinne einer Permeabilitäts-erhöhung für niedermolekulare Bausteine von Nukleinsäuren und Proteinen hervorrufen und so durch erhöhtes Bausteinangebot in der Zelle eine Synthesesteigerung bewirken.

Bei Peptidhormonen, wie Vasopressin und Insulin, die den Membrantransportprozeß beeinflussen, befindet sich laut HECHTER (1965) der Hormonrezeptor sehr wahrscheinlich an der Zelloberfläche. Da die für die Bildung von 3',5'-AMP verantwortliche Adenylzyklase wohl in der Zellmembran lokalisiert ist (SUTHERLAND 1960), ist auch bei Adrenalin, Glucagon und ACTH, die wie Vasopressin zur erhöhten Bildung von 3',5'-AMP führen, die Lokalisation des Rezeptors in der Zellmembran wahrscheinlich (HECHTER 1965). Neuere Ergebnisse (JEFFERSON et al. 1968) lassen vermuten, daß 3',5'-AMP auch bei der Insulinwirkung von Bedeutung ist; sie zeigen eine Verminderung der 3',5'-AMP-Konzentration in der Rattenleber durch Insulin. Der durch Aldosteron hervorgerufene Na^+ -Transport durch Zellmembranen geht nach DE WEER und CRABBE' (1968) auf eine de novo-Synthese von Proteinen zurück.

SUTHERLAND (1965) postulierte einen "two messenger" - Mechanismus der Hormonwirkung. Danach steht das Hormon (1. messenger) mit einem Bestandteil der Zellmembran in Wechselwirkung und bewirkt dadurch eine Anhäufung eines Mediators (2. messenger), der dann auf Bestandteile der Zelle einwirkt. Als einen Mediator sieht er 3',5'-AMP an. Die Bedeutung von 3',5'-AMP bei der Wirkung von Hormonen wird immer deutlicher. So erzielten HECHTER et al. (1967) durch dieses Nukleotid wie auch durch eine Reihe anderer Nukleotide im isolierten Rattenuterus östrogenähnliche anabole Effekte (u.a. Steigerung von RNA- und Proteinsynthese).

NILSSON (1966) konnte unter Östrogeneinwirkung Strukturänderungen in der Zellmembran von Epithelzellen des Rattenuterus feststellen. In Vesikulardrüsen 10-11 Tage alter Ratten, bei denen Testosteron noch keine Sekretbildung und erst geringe

Beeinflussung des Einbaus von ^{14}C -Thymidin in die DNA auslöst, fanden DAHNKE und MOSEBACH (1969) unter dem Einfluß dieses Hormons eine Erweiterung der Interzellularspalten zwischen den Epithelzellen sowie eine mächtige Entwicklung des Golgi-Apparates. BANGHAM et al. (1965) zeigten, daß bimolekulare Lamellen von Phospholipiden, die in ihren Permeabilitätseigenschaften biologischen Membransystemen ähnlich sind, ihre Permeabilität für Na^+ - und K^+ -Ionen unter dem Einfluß von Steroidhormonen wie Progesteron, Diäthylstilböstrol, Corticosteron und Androsteron signifikant erhöhen, unter dem Einfluß von Cortisol und Cortison dagegen leicht vermindern.

Bei der Aufklärung der Beeinflussung von Membranpermeabilitäten ergeben sich experimentelle und mathematische Schwierigkeiten. HECKMANN (1965) hat Gleichungen für die Diffusion über einen beweglichen Carrier aufgestellt, da er das Vorhandensein eines beweglichen Carriers für sehr wahrscheinlich hält. Die detaillierte Diffusionskinetik von Teilchen durch biologische Membranen ist jedoch bisher noch nicht aufgeklärt worden, da die natürlichen Systeme zu kompliziert sind, als daß ihnen die bisher aufgestellten mathematischen Modelle gerecht werden könnten.

Selbst für den Fall, daß die Hormonwirkung auf eine Beeinflussung der Genaktivität zurückzuführen wäre, gibt HECHTER (1965) zu bedenken, daß die Auswirkung am genetischen Apparat Folge einer primären Reaktion des Hormons an der Zellmembran sein könnte.

3. Genaktivierung

Unter den Theorien über die Wirkungsweise von Hormonen im allgemeinen und den Steroidhormonen im besonderen nimmt die Theorie von KARLSON (1965, KARLSON und SEKERIS 1966a) und JACOB und MONOD (1961) über die Hormonwirkung als Genaktivierung im Kern eine bevorzugte Stellung ein.

KARLSON (1965) hat das von JACOB und MONOD (1961) aufgrund ihrer Arbeiten mit einem bakteriellen System (*E. coli*)

K-12) vorgeschlagene Induktionsschema mit dem Wirkungsmechanismus von Hormonen in Zusammenhang gebracht.

Danach steht die DNA im Kern unter dem Einfluß von sog. Repressoren. Das Hormon wirkt als Induktorsubstanz, es führt zur allosterischen Umformung der Genrepressoren und damit werden die Genabschnitte frei. An den nun zur Verfügung stehenden DNA-Bereichen wird die Synthese der m-RNA in Gang gebracht. Diese führt zur Eiweißvermehrung und damit z.B. zur Organvergrößerung (Hypertrophie).

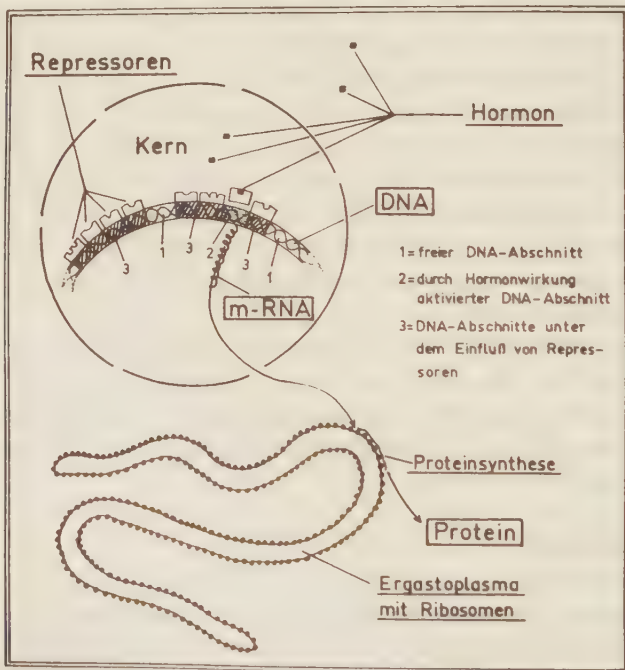


Abb. 1 Hormonwirkung als Genaktivierung

Stützen für diese Theorie wurden vor allem bei der Untersuchung der Wirkung des Ecdyson, des Verpuppungshormons der Insekten, gefunden. Nach Inaktivierung eines Genrepressors ent-

wickelt sich an dieser Stelle ein sog. "Puff". Bei den Riesenchromosomen aus den Speicheldrüsen von Insekten ist diese Puffbildung gut zu beobachten. CLEVER (1965) erzielte nach Injektion von Ecdyson in das letzte Larvenstadium von *Chironomus tentans* an bestimmten Stellen der Riesenchromosomen Puffs, die sich in charakteristischer Reihenfolge entwickelten. KARLSON und SEKERIS (1966b) fanden bei *Calliphora*-Larven durch Ecdyson eine Enzyminduktion der DOPA-Decarboxylase und konnten in isolierten Epidermiskernen die RNA-Synthese stimulieren.

Mit Testosteron konnten DREWS und WACKER (1967) bei *Pseudomonas testosteroni* eine Enzyminduktion (de novo-Synthese von Protein) nachweisen.

Als Repressoren werden in der Säugetierzelle vor allem Histone in Betracht gezogen. ALLFREY et al. (1963) konnten zeigen, daß Histone (besonders die argininreichen) in isolierten Thymuskernen die RNA-Synthese hemmen. SEKERIS und LANG (1965) fanden in Leberkernen der Ratte eine Bindung von Cortison an die Histonfraktion, nicht dagegen an DNA oder RNA.

b) Charakteristische Beispiele von biochemischen Wirkungen der Steroidhormone (Androgene, vergleichsweise Östrogene und Corticosteroide)

1. Förderung der Proteinsynthese

Die anabole Wirkung von Androgenen wurde schon 1935 durch KOCHAKIAN (1946) nachgewiesen. Sie zeigt sich durch eine negative Stickstoffbilanz und eine Erhöhung des Körpergewichtes, die im wesentlichen auf eine Steigerung der Muskelmasse zurückzuführen ist. Diese Vermehrung ist durch eine Förderung der Proteinsynthese bedingt.

Einige Organe, wie Vesikulardrüsen und Prostata, zeigen unter dem Einfluß von Androgenen eine um ein Vielfaches größere Gewichtszunahme. Solche Organe nennt man Erfolgsorgane des Hormons. Versuche zur Erforschung der Hormonwirkung

sind logischerweise nur an solchen Tieren durchführbar, die selbst kein Hormon produzieren, also an kastrierten oder an unreifen Tieren.

Bei kastrierten Mäusen und Meerschweinchen zeigte KOCHAKIAN (1965) die proteinanabole Wirkung des Testosteron speziell an Vesikulardrüsen und Prostata. KASSENAAAR et al. (1962) führen den durch Testosteronbehandlung kastrierter Mäuse erzielten Gewichtsanstieg der Vesikulardrüsen auf Hypertrophie und Hyperplasie, den der Nieren dagegen nur auf Hypertrophie zurück. Bei mit Testosteron behandelten unreifen Ratten wiesen MOSEBACH et al. (1967b) eine Einbausteigerung von ^{14}C -Histidin in die Proteine von Vesikulardrüsen und m. levator ani nach, während der Einbau in die Thymus-Proteine gehemmt wurde. FUJII und VILLEE (1967) konnten zeigen, daß die aus Vesikulardrüsen mit Testosteron vorbehandelter unreifer Ratten extrahierte RNA, ins Vesikulardrüsenlumen un behandelter Ratten eingebracht, dort das Wachstum stimulierte. Den gleichen Effekt hatte RNA aus Vesikulardrüsen, Prostata, Leber und Nieren erwachsener Ratten, wogegen RNA aus Prostata oder Leber von mit Testosteron behandelten unreifen Tieren wirkungslos blieb.

Östrogene bewirken in ihren Erfolgsorganen gleichfalls eine Steigerung der Proteinsynthese (MUELLER 1965). UNHJEM et al. (1968) fanden eine Hypertrophie des Uterus-Epithels ovari-ektomierter Ratten, denen RNA aus Uteri mit Östradiol-17 β vorbehandelter Tiere in das Uteruslumen infundiert wurde.

2. Förderung der RNA-Synthese

Der proteinanabole Effekt ist auf eine gesteigerte RNA-Synthese zurückführbar. Es ist sicher, daß schon relativ früh, 20 min nach einmaliger Testosterongabe, die RNA-Synthese in den Vesikulardrüsen von Ratten, nachgewiesen durch den Einbau von Vorstufen (z.B. radioaktiv markiertem Phosphat), beeinflußt wird (WICKS et al. 1965).

KOCHAKIAN und HARRISON (1962) zeigten, daß bei Mäusen die durch Kastration abgesunkene Konzentration an Gesamt-RNA unter Androgeneinfluß in Niere, Vesikulardrüsen und Prostata

wieder gesteigert wird. Im Thymus tritt ein umgekehrter Effekt ein. WICKS et al. (1965) erhielten in Vesikulardrüsen kastrierter Ratten durch Testosteron eine Einbauförderung von ^{32}P in die transfer-RNA durch de novo-Synthese (kein turnover der terminalen Nukleotide), GREENMAN et al. (1965) eine Einbausteigerung in die hochmolekulare RNA, die aber weiter nicht aufgetrennt werden konnte. In den Nieren von Mäusen (Hungertiere) fanden KOCHAKIAN und HILL (1966) eine Steigerung des Einbaus von ^{14}C -Orotsäure in die RNA durch Kastration, die durch Testosteronpropionatbehandlung auf den Normalwert gesenkt wurde. Diesen erstaunlichen Effekt erklärt er durch einen erhöhten Umsatz von RNA-Vorstufen bei kastrierten Tieren.

Bei unreifen Ratten fanden FUJII und VILLEE (1968) nach einer einzigen Injektion von Testosteron (1 mg) eine Einbausteigerung von ^3H -Cytidin in die RNA von Vesikulardrüsen, Prostata und Leber. Keine Änderung zeigte sich im Thymus. Dagegen erhielten sie beim Einbauversuch mit ^{32}P unter Testosteroneinfluß ein Absinken der spezifischen ^{32}P -Aktivität in der cytoplasmatischen RNA von Vesikulardrüsen und Prostata (VILLEE und FUJII 1966). MOSEBACH et al. (1967a) erhielten durch Testosteron eine Hemmung des Einbaus von ^{14}C -Uridin in die RNA von Vesikulardrüsen unreifer Ratten. Dabei nahm die RNA-Konzentration zu (MOSEBACH und ENGELS 1966, FUJII und VILLEE 1968).

LIAO et al. (1966) konnten zeigen, daß sich die von isolierten Prostata-Kernen androgenbehandelter kastrierter Ratten synthetisierte RNA in der Häufigkeit des Auftretens bestimmter benachbarter Nukleotidpaare von der RNA der Kontrollen unterschied. Durch Actinomycin D wurde dieser Unterschied aufgehoben. Durch geschickte Versuchsanordnungen kamen LIAO und LIN (1967) zu dem Ergebnis, daß Androgene in der Prostata nur an weniger als 1% des Kern-Chromatins eine selektive Steigerung der RNA-Synthese bewirken und daß die dort befindliche DNA reich an Desoxycytidyl(3',5')desoxyguanosin ist. LIAO et al. (1966) vermuten, daß dieser Teil der DNA dem Nucleolus entspricht. Dazu passen die Ergebnisse von PELLEGRINO und POLLERA (1967), die elektronenmikroskopisch Strukturänderungen im Nu-

cleolus des m. levator ani unter Testosteroneinwirkung festgestellt haben.

Die Förderung der RNA-Synthese im Rattenuterus durch Östrogene wurde vielfach nachgewiesen (MOORE und HAMILTON 1964, GORSKI und NELSON 1965, MEANS und HAMILTON 1966). HAMILTON (1964) zeigte, daß die Steigerung der RNA-Synthese unter Östrogeneinfluß, die der Proteinsynthese vorausgeht, selbst wieder von der Synthese gewisser Proteine abhängig ist.

Auch Corticosteroide steigern die RNA-Synthese, wie KENNEY und KULL (1963) mit Hydrocortison an der Kern-RNA der Rattenleber nachwiesen. FEIGELSON et al. (1962) erzielten durch Cortisonacetat eine Einbausteigerung von ^{32}P in die RNA aller Leberzellfraktionen und von ^{14}C -Glycin in die Proteine aller Fraktionen.

3. Förderung der DNA-Synthese

Es hat sich herausgestellt, daß Testosteron in den Vesikulardrüsen außer einer Stimulierung der Proteinsynthese und der Steigerung der RNA-Synthese auch die DNA-Synthese fördert. MOSEBACH und ENGELS (1966) fanden eine deutlich gesteigerte Aufnahme von ^{14}C -Thymidin in die Vesikulardrüsen unreifer Ratten schon 18 Stunden nach einmaliger Testosterongabe. Die Radioaktivität in der extrahierten DNA ist nach 5tägiger Testosteronvorbehandlung auf das 2-3fache gesteigert, die Kerne enthalten die 3fache ^{14}C -Aktivität der Kontrollen. Die Konzentration der DNA nimmt unter Testosteroneinfluß ab, die Menge DNA pro Vesikulardrüse zu.

Bei kastrierten Mäusen fanden KASSENAAR et al. (1962) unter Testosteroneinfluß während der ersten 24 Stunden in den Vesikulardrüsen eine konstante DNA-Menge. Da Gewicht und RNA-Gehalt anstiegen, fiel die DNA-Konzentration ab. Nach 48 Stunden und 72 Stunden war auch der DNA-Gehalt angestiegen.

Der beobachteten Einbausteigerung in die DNA unreifer Tiere unter Testosteroneinfluß (MOSEBACH und ENGELS 1966) entspricht ein qualitativ gleich verlaufender Anstieg der Mitoserate (DAHNKE et al. 1968), der bereits 9 Stunden nach einmali-

ger Testosterongabe signifikant war. Ein Mitoseanstieg zeigte sich auch im Epithel des Mäuseuterus nach Östroninjektion ($2 \times 2,5 \mu\text{g}$) auf das 4,5fache (EPIFANOVA 1966).

FAHMY et al. (1967) konnten die DNA-Polymerase aus Kalbsthymus in vitro durch Östradiol- 17α , Östradiol- 17β , Östriol und 16-Epiöstriol signifikant stimulieren, während Östron, Testosteron und Cortison keine Wirkung hatten.

4. Einfluß auf RNA-Bausteinkonzentrationen

KOCHAKIAN und HILL (1966) fanden in Nieren kastrierter Mäuse unter Testosteroneinfluß bei Einbaustudien von ^{14}C -Orotsäure in die RNA etwa 70% der Radioaktivität des Pools in Uracil, Uridin und seinen Nukleotiden, der Rest lag in Form von Cytosinkomponenten vor. Androgenbehandlung änderte die Konzentration von U nicht wesentlich, senkte die von UN und steigerte die der Nukleotide. Die Kastration hatte die spezifische Radioaktivität der Bausteine auf das Doppelte gesteigert, entsprechend war auch die spezifische ^{14}C -Aktivität der RNA verändert. Testosteroneinwirkung senkte die spezifische ^{14}C -Aktivität von U, normalisierte die von UN, UMP, UDP und RNA und ließ die von UTP gesteigert.

GORSKI und MUELLER (1963) untersuchten den RNA-Bausteinpool im Rattenuterus unter Östrogeneinfluß. Der Einbau von ^{32}P in UTP wurde auf 250% gesteigert. Der Effekt soll hauptsächlich auf Änderungen in der Größe des Pools zurückzuführen sein, nicht auf die Phosphorylierungsrate. Merklich erhöht wurde außerdem noch der Einbau von ^{32}P in ATP, ADP, UDPG und UDPAG.

c) Transport des Testosteron im Plasma und seine Bindung in der Zelle

MOSEBACH und DIRSCHERL (1964) haben bei ihren bisherigen Studien über das in vivo-Schicksal von Testosteron den Eindruck gewonnen, daß die initiale Verteilung nicht so sehr den Kern betrifft, sondern daß das Cytoplasma im Vordergrund steht. Sie sahen bei 40 Tage alten Ratten 10 und 20 min nach Gabe von ^{14}C -Testosteron die höchste spezifische Radioaktivität bei Nie-

ren, Hoden und Oberschenkelmuskel im Cytoplasma, bei der Leber nach 10 min in der Mikrosomenfraktion, nach 20 min ebenfalls im Cytoplasma. Von den korpuskulären Fraktionen enthielten nach 20 min die Mitochondrien die höchsten spezifischen ^{14}C -Aktivitäten. In den akzessorischen Sexualorganen 30 Tage alter Ratten fand sich die ^{14}C -Aktivität nach Gabe von ^{14}C -Testosteron hauptsächlich in den apikalen und basalen Cytoplasmabereichen der Epithelzellen (MOSEBACH 1968). Bindungsorte brauchen jedoch nicht bevorzugte Wirkungsorte zu sein. LIPPERT et al. (1967) fanden nach Injektion von ^{14}C -Testosteron in unreife Ratten keine Radioaktivität in Kern-DNA und -RNA und cytoplasmatischer RNA der Leber, dagegen enthielten Kern- und Plasmaproteine fest gebundene Metabolite.

Testosteron wird vom Plasmaeweiß gebunden und transportiert. So fand MERCIER (1966) im menschlichen Plasma nach Inkubation mit radioaktiv markiertem Testosteron eine Bindung an Albumin und an eine β -Globulinfraktion. VERMEULEN und VERDONCK (1968) kamen zum gleichen Ergebnis, sie zeigten, daß das Testosteron-bindende Globulin spezifisch für Steroide mit einer 17β -Hydroxylgruppe ist und daß es daher auch Östradiol bindet.

MANGAN et al. (1967) fanden in vitro eine Bindung von Testosteron hauptsächlich an die DNA in Prostata-Kernen kastrierter Ratten. Bei nicht kastrierten Tieren war die Aufnahme geringer und geschah vorwiegend in die Histonfraktion.

d) Problemstellung und Begründung der Versuchsanordnung

Der primäre Wirkungsort des Testosteron ist selbstverständlich an einer Stelle zu suchen, die mit der Proteinvermehrung zu tun hat, da die Vesikulardrüsen als Ausdruck einer vermehrten Proteinsynthese wachsen. Also muß, wie schon erwähnt, auch die Nukleinsäuresynthese sehr frühzeitig beeinflusst werden.

Da nun aber die vermehrte Nukleinsäuresynthese aus Bausteinen erfolgt, ist natürlich die Bausteinkonzentration in der Zelle mit und ohne Testosteronvorbehandlung von besonderem Interesse. Wir haben uns zur Aufgabe gestellt, die Konzentration

an DNA-Bausteinen in einigen Organen unreifer Ratten unter besonderer Berücksichtigung der Vesikulardrüsen zu untersuchen, da die unter Testosteroneinfluß zu beobachtende Vermehrung der DNA Ausgangspunkt für eine gesteigerte RNA- und Proteinsynthese (Hyperplasie) ist.

Es wäre denkbar, daß das Testosteron irgendwelche Veränderungen an der Kernmembran im Sinne einer gesteigerten Permeabilität für DNA-Bausteine verursacht. Der "Sog", der vom Kern ausgeht, müßte dann zu einer Verarmung des Cytoplasmaraumes an DNA-Bausteinen führen, vorausgesetzt, daß die in den Kernraum vermehrt eingetretenen Bausteine dort auch vermehrt eingebaut werden. Das gleiche Phänomen müßte sich bei einer Aktivierung der an der DNA-Synthese im Kern unmittelbar beteiligten Enzyme zeigen.

Andererseits könnte der Angriff des Testosteron aber auch an der Zellmembran erfolgen, so daß die DNA-Synthese durch erhöhte Bausteinzufuhr gefördert würde. Das wäre dann mit einer erhöhten Konzentration an Bausteinen im Cytoplasmaraum verbunden.

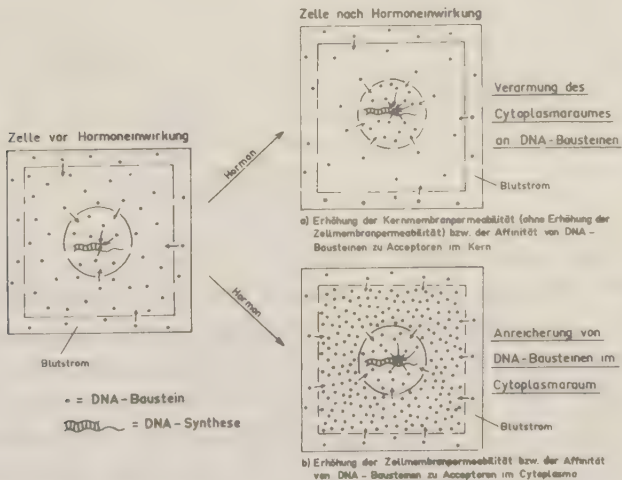


Abb. 2 Zwei Modelle für die Einwirkung von Testosteron auf die Permeabilität von Membranen

Experimenteller Teil

I. Methodik

a) Tiere und Injektionen

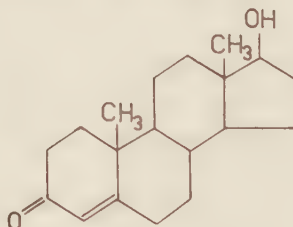
1. Tiermaterial

Um die Versuchsbedingungen möglichst physiologisch zu gestalten, verwendeten wir keine kastrierten sondern unreife Tiere. Es handelte sich dabei um männliche Wistar-Ratten, die wir vom Zentralinstitut für Versuchstierzucht in Hannover-Linden bezogen. Sie trafen in der Regel im Alter von 21 Tagen bei uns ein und wurden mit Fischmehlstäbchen ad libitum ernährt. Wasser stand ihnen ebenfalls nach Belieben zur Verfügung.

2. Testosteronvorbehandlung

Fünf Tage lang, vom 26. bis zum 30. Lebenstag, erhielt die Hälfte des Tierkollektivs eine Injektion von

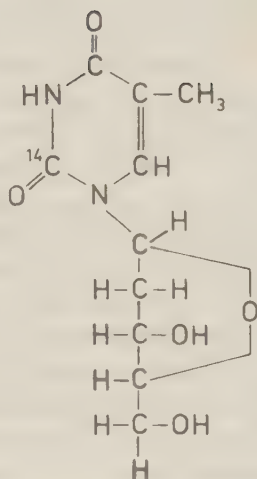
Testosteron



Und zwar wurde jedem Tier 0,1 mg Testosteron in 0,2 ml Sesamöl täglich abends jeweils zur gleichen Zeit injiziert. Die Injektionen erfolgten subcutan unter die Bauchhaut. Die übrigen Tiere, die als Kontrollen dienten, erhielten nur 0,2 ml Sesamöl. Es wurden jeweils 15-16 Tiere für die Versuche verwendet, wobei die Anzahl der mit Testosteron vorbehandelten Tiere etwas geringer war als die Zahl der Kontrolltiere, da bei den letzteren die Vesikulardrüsen kleiner sind.

3. Thymidininjektion

Am 31. Lebenstag wurden die Tiere gewogen und erhielten eine intraperitoneale Injektion von radioaktiv markiertem Thymidin, gelöst in physiologischer Kochsalzlösung. Das Thymidin erhielten wir als Thymidin-2- ^{14}C vom "Radiochemical Centre Amersham", England. Es befanden sich jeweils 100 μC in 0,5 ml aqua dest. unter Vakuumverschluß in einer sterilisierten Ampulle. Die Konzentration der Radioaktivität belief sich auf 35,9 bzw. 37,9 mC/mMol Thymidin. Nach Öffnen der Ampulle füllten wir die radioaktive Lösung mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9%) auf 3,8 ml auf.



Thymidin-2- ^{14}C

Das Durchschnittsgewicht der Tiere betrug bei den einzelnen Versuchen zwischen 75 und 80 Gramm. Von der radioaktiven Lösung nahmen wir jeweils 0,200 ml, bezogen auf das Durchschnittsgewicht der Tiere. Mit Hilfe einer Korrekturkurve ermittelten wir die Lösungsmengen für andere Gewichte. Leichtere oder schwerere Tiere erhielten entsprechend weniger bzw. mehr injiziert.

b) Aufarbeitung der Organe und Reinigung der Extrakte

1. Organentnahme

Je nach Versuch eine, zwei oder drei Stunden nach der Injektion mit Thymidin-2- ^{14}C wurden die Tiere unter Äthernarkose dekapitiert. Von jedem Tier wurde eine Portion des ausfließenden Blutes gesammelt und sowohl alle Portionen der unbehandelten als auch der mit Testosteron vorbehandelten Tiere in je ein Homogenisiererröhrchen gegeben. Diese Gefäße

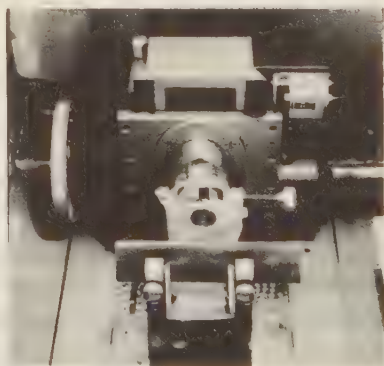
wurden mit Trockeneis gekühlt. Dann entnahmen wir den Tieren die Vesikulardrüsen, ein Stück der Leber und die Nieren. Von den entnommenen Organen wurde sogleich das Frischgewicht bestimmt. Nach Addition der einzelnen Gewichte wurde bei den letzten Organen so verfahren, daß die jeweils sich entsprechenden Organportionen gleiches Gewicht hatten. Die Summe der Einzelgewichte der entnommenen Vesikulardrüsen betrug bei den vorgenommenen Versuchen 110 - 160 mg. Es erwies sich als zweckmäßig, das Gewicht der Nieren und Leberportionen auf 2 oder 3 Gramm einzustellen, um noch meßbare ^{14}C -Aktivitäten an Nukleinsäurebausteinen in der säurelöslichen Fraktion zu erhalten. Die entnommenen Organe aller mit Testosteron vorbehandelten und aller unvorbehandelten Tiere (Kontrollen) wurden jeweils gesammelt, und zwar wurden die Organe sofort nach der Entnahme mit aqua dest. über Trockeneis auf Gefrierstempeln eingefroren.

2. Gewebezerkleinerung

Die auf den Gefrierstempeln gesammelten Organe wurden sofort nach Beendigung der Organentnahme im WKF-Kryotom (Gefriermikrotom) bei -25°C in 10 μ - Schnitte (Vesikulardrüsen) bzw. 20 μ - Schnitte (Nieren und Leber) zerlegt. Die Schnitte

Abb. 3

Auffangvorrichtung für
Organschnitte im Kryotom



wurden darauf in Homogenisierröhrchen eingepinselt. Die Vesikulardrüsenschnitte wurden mit etwa 10 ml, die Nieren- und Leberschnitte mit etwa 7 ml 0,6 n eiskalter Perchlorsäure versetzt und unter Eiskühlung homogenisiert.

Bei einem Teil der Versuche wurden Leberstücke und Nieren nach der Entnahme zerkleinert und sogleich homogenisiert, ohne in Schnitte zerlegt worden zu sein.

Das in Homogenisierröhrchen gesammelte Blut wurde ebenfalls gewogen, mit aqua dest. (ca. 2 ml) auf ein definiertes Volumen aufgefüllt und homogenisiert. Von dem Homogenat wurden je nach Versuch 3-4 Gramm entnommen, mit 0,6 n Perchlorsäure bis auf 10 ml aufgefüllt, nochmals homogenisiert und der im folgenden beschriebenen Perchlorsäureextraktion zugeführt. Der Rest wurde in einer Gefriertrockenanlage getrocknet und seine Radioaktivität durch SCHÖNIGER-Verbrennung (SCHÖNIGER 1955) bestimmt.

3. Extraktion

In Anlehnung an PECHAN und MARKO (1963) führten wir eine Perchlorsäureextraktion durch.

Das Homogenat wurde in ein 10 ml WKF-Plastikzentrifugenröhrchen überführt. Zweckmäßigerweise homogenisiert man zunächst in 5 ml der 0,6 n HClO_4 und spült unter nochmaligem Homogenisieren mit dem Rest nach.

Die in 0,6 n HClO_4 homogenisierten Organe wurden sodann in einer WKF-Ultrazentrifuge 10 Minuten bei 16.000 Umdrehungen pro Minute (ca. 20.000 g) bei einer Temperatur von ca. $2^\circ - 4^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Die Überstände wurden in 25 ml-Schliffzentrifugengläser überführt und kaltgestellt (0°C). Der Proteinrückstand wurde zwecks Auswaschen mit einem Glasstab nach portionsweiser Zugabe von 10 ml 0,2 n eiskalter Perchlorsäure aufgerührt und zu einer feinen Verteilung in der Flüssigkeit gebracht. Nach nochmaligem Zentrifugieren (16.000 U/min, 10 min, $2^\circ - 4^\circ\text{C}$) wurde der Überstand zu dem vorigen in die großen Zentrifugengläser gegeben.

Der Proteinrückstand wurde mit aqua dest. gewaschen, in Zentrifugengläser überführt und in der Laborzentrifuge bei 3.000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, der gewaschene Proteinrückstand im Exsiccator über Phosphorpentoxyd getrocknet. Die in den Proteinrückständen noch enthaltene Radioaktivität wurde, teilweise vor und nach Nukleinsäure-Extraktion (FERGUSON und WOOL 1962), durch SCHÖNIGER- bzw. SIMON-Verbrennung ermittelt (SCHÖNIGER 1955, SIMON et al. 1959).

4. Reinigung der Extrakte

Die vereinigten Überstände im großen (25 ml) Zentrifugenglas (also die extrahierte sog. säurelösliche Fraktion) wurden mit 6 n Kalilauge neutralisiert, mit Hilfe einer Methanol/Trockeneis-Kältemischung bis zum Gefrierpunkt abgekühlt und in der Kälte mit der Laborzentrifuge abzentrifugiert (3.000 U/min, 5 min). Der resultierende Kaliumperchlorat-Niederschlag wurde mit ca. 3 ml aqua dest. nachgewaschen, abzentrifugiert und die Waschflüssigkeit zum Überstand der vorhergehenden Zentrifugation in ein großes Zentrifugenglas gegeben.

Zu der gleichen Menge bei 0°C gesättigter Kaliumperchlorat-Lösung fügten wir zwecks Ausbeutebestimmung bei der folgenden Adsorption und Elution einen Thymidinstandard bekannter Radioaktivität hinzu.

Adsorption der Extrakte an Aktivkohle

Die im folgenden beschriebene Aktivkohlebehandlung erfolgte in Anlehnung an TSUBOI und PRICE (1959).

Nunmehr wurden zu jedem Extrakt und zum Standard, den wir bei allen folgenden Arbeitsgängen bis zur Radioaktivitätsbestimmung genauso behandelten wie die Extrakte, 40 mg NORITA-Aktivkohle hinzugegeben. Vorher wurden die Extrakte durch Hinzufügen von einem Tropfen stark verdünnter Essigsäure auf pH 5-6 gebracht. Die Zentrifugengläser wurden sorgfältig verschlossen und in der Schüttelmaschine 12 Stunden bei Zimmertemperatur geschüttelt. Dabei wurden die Nukleinsäure-Bausteine an die Aktivkohle adsorbiert. Die Adsorption erfolgte nahezu quantitativ,

wie wir durch Versuche feststellten. Schon rein äußerlich läßt sich der Fortgang der Adsorption verfolgen: die durch allerlei Pigmente leicht gelblich gefärbten Extrakte werden mit fortschreitender Adsorption immer heller und schließlich wasserklar.

Vorbereitung der Aktivkohle

Die zur Adsorption der Nukleinsäure-Bausteine verwendete NORIT A - Aktivkohle wurde folgendermaßen vorbereitet:

10 g NORIT A wurden mit etwa 50 - 60 ml 0,1 n HCl einige Stunden mit dem Magnetrührer gerührt, dann abfiltriert und solange mit aqua dest. nachgespült, bis im Filtrat keine Chlorid-Ionen mehr nachweisbar waren. Dann wurde die so vorbehandelte Aktivkohle in 150 ml aqua dest. als Suspension angesetzt, von der wir die benötigten Mengen abpipettierten. 40 mg NORIT A entsprechen dabei 0,6 ml Suspension.

TSUBOI und PRICE (1959) verwenden zur Adsorption ihrer Standards von Nukleinsäure-Bausteinen geringere Mengen an NORIT A - Aktivkohle und kürzere Adsorptionszeiten. Unsere Versuche haben jedoch gezeigt, daß im Interesse einer möglichst quantitativen Adsorption der Nukleinsäurebausteine aus den Extrakten größere Kohlemengen (40 mg) und längere Adsorptionszeiten wünschenswert sind.

Elution von der Aktivkohle

Nach 12 Stunden wurde abzentrifugiert (Laborzentrifuge) und der Überstand verworfen. Der Aktivkohlerückstand wurde einmal mit 10 ml 0,1 n HCl gewaschen und gleich dabei in PYREX - Zentrifugengläser mit Schraubverschluß und Teflondichtung überführt. Wir kühlten mit der schon erwähnten Kältemischung bis zum Gefrierpunkt und zentrifugierten ab. Es folgten 4 Waschungen mit aqua dest., jeweils 10 ml. Nach jeder Waschung wurde in der Kälte abzentrifugiert.

Das so erhaltene Kohlesediment wurde nun unter dauerndem Schütteln mit 10 ml einer 10% Pyridinlösung in 50% Äthanol 12 - 18 Stunden geschüttelt. Dabei werden die Nukleinsäure-Bausteine von der Aktivkohle eluiert.

Beim Schütteln müssen die Zentrifugengläser mit ihrer Längsachse parallel zur Schüttelrichtung liegen, da andernfalls die Aktivkohle nur sanft geschaukelt wird, was zur Elution nicht ausreicht.

Sodann wurde abzentrifugiert, der Überstand in Spitzkolben gegeben, einmal mit 5 ml 10% Pyridin in 50% Äthanol nachgewaschen und die Waschflüssigkeit mit dem Überstand vereinigt.

Bei dieser Elution erhielten wir hohe Ausbeuten, die sich im Bereich zwischen 82% und nahezu 100% bewegten. Um aber jeweils die noch an Kohle gebundenen Restaktivitäten bestimmen zu können, wurde nach der Elution der Aktivkohlerückstand über Phosphorpentoxyd und Paraffinschnitzeln im Exsiccator getrocknet und nach der Trocknung der SCHÖNIGER-Verbrennung (SCHÖNIGER 1955) zugeführt.

Radioaktivitätsbestimmung

Der mit der Waschflüssigkeit vereinigte Überstand wurde im Rotationsverdampfer eingedampft, mit 70% Äthanol aufgenommen und wieder eingedampft. Dieses diente zur völligen Befreiung des Eluates von Pyridin. Der Rückstand wurde mit 2 ml aqua dest. aufgenommen und davon 2 x 0,1 ml zur Radioaktivitätsbestimmung im Flüssig-Szintillations-Spektrometer abpipettiert. Eine dieser beiden Messungen wurde zur Ausbeutebestimmung mit einem Benzoesäure- ^{14}C -Standard versetzt. Mit Hilfe des mitgeführten Thymidinstandards bestimmten wir die Ausbeute der Aktivkohleadsorption und nachfolgenden Elution. Die übrigen 1,8 ml der wässrigen Lösung wurden eingedampft und der Rückstand zur genaueren Analyse chromatographiert.

5. Nukleinsäureextraktion

Die Nukleinsäuren wurden nach der Methode von FERGUSON und WOOL (1962) extrahiert.

Von dem getrockneten Rückstand der Rohproteine wurden 20-25 mg im Achat-Mörser fein gepulvert und in ein Zentrifugenglas überführt. Dieses Pulver wurde 3 mal mit 3 ml eiskalter 10% Trichloressigsäure gewaschen und die Waschflüssigkeit ver-

worfen. Danach wurde der Rückstand 4 mal durch Zentrifugieren mit kaltem 95% Äthanol gewaschen und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Niederschläge mit 5 ml 10% Kochsalzlösung bei 100°C 30 min lang extrahiert. Während der Extraktion hielten wir durch Zugabe von 0,1 n NaOH und einigen Tropfen Bromthymolblau als Indikator den pH-Wert auf 7.

Sodann wurden die Proteine, nach Kühlen der Lösung mit Leitungswasser, abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 50 ml - Zentrifugenglas gegossen und im Eisschrank kühlgestellt. Die Extraktion wurde im gleichen Glas wie oben wiederholt. Der zweite abzentrifugierte Extrakt wurde zu dem ersten ins große Zentrifugenglas gegeben. Dann gaben wir 25 ml 96% Äthanol hinzu und ließen dieses Gemisch im verschlossenen Zustand in der Tiefkühltruhe über Nacht bei -10°C stehen. Die Nukleinsäuren fallen aus.

Am nächsten Morgen wurde in der Laborzentrifuge bei 3.000 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Nukleinsäure-Rückstand wurde 2 mal mit 96% kaltem Äthanol gewaschen und die Waschflüssigkeit ebenfalls verworfen. Nun wurde der Nukleinsäure-Rückstand im Exsiccator über Phosphorpentoxyd und Paraffinschnitzeln getrocknet. Die trockenen Nukleinsäuren wurden in 0,1 n Natronlauge gelöst und ihre Radioaktivität im Flüssig-Szintillations-Spektrometer bestimmt.

6. Zellfraktionierung

Um eine Übersicht der Radioaktivitätsverteilung auf die einzelnen Zellbestandteile zu erhalten, führten wir eine Zellfraktionierung nach ALLFREY (1959) durch. Die entnommenen Organe wurden im WKF-Kryotom in 10 μ -Schnitte zerlegt und diese Schnitte in Homogenisierröhrchen eingepinselt.

Wir gaben 5 ml einer isotonischen (0,25 m) Rohrzuckerlösung hinzu, die zur Stabilisierung der Nukleoproteide 0,003 m $MgCl_2$ enthielt, und homogenisierten unter Eiskühlung 1 min. Das Homogenat wurde mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe durch MOLTON-PERLON-Gaze in Saugröhrchen filtriert. Dieses Filtrat wurde in 10 ml - WKF - Plastikzentrifugenröhrchen abgefüllt und in der

präparativen Ultrazentrifuge bei 1.000 g (3.720 U/min) 7 min lang zentrifugiert. Wir resuspendierten das Sediment in 2 ml 70% Äthanol und zentrifugierten 10 min lang bei 1.000 g. Die Waschflüssigkeit wurde verworfen, das Sediment, das ausschließlich (nach mikroskopischer Kontrolle) aus Kernen besteht, bis zur Weiterverarbeitung kühlgestellt.

Der Überstand der Kernsedimentation wurde 10 min lang bei 5.000 g (8.460 U/min) zentrifugiert, das Sediment in 2 ml 70% Äthanol resuspendiert und 10 min lang bei 9.800 U/min erneut zentrifugiert. Die Waschflüssigkeit wurde verworfen, das Sediment, das aus Mitochondrien besteht, kühlgestellt. Der Überstand der Mitochondriensedimentation wurde mit isotonischer Rohrzuckerlösung aufgefüllt und das volle Zentrifugenröhrchen 30 min lang bei 45.000 U/min zentrifugiert. Das Sediment stellt die sog. Mikrosomenfraktion dar (ein Gemisch aus Ribosomen und Membranbruchstücken), der Überstand die Cytoplasmafraktion.

Kerne, Mitochondrien und Mikrosomenfraktion wurden im Exsiccator über Phosphorpentoxyd und Paraffinschnitzeln im Vakuum, die Cytoplasmafraktion in der Gefriertrockenanlage getrocknet. Da bei der geringen Radioaktivität dieser Proben die natürliche ^{14}C -Aktivität schon sehr ins Gewicht fällt, wurden zur Kontrolle auch 10 ml isotonische Rohrzuckerlösung der Gefriertrocknung unterworfen.

Die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurde durch SCHÖNIGER-Verbrennung (SCHÖNIGER 1955) bestimmt.

7. Anhang: Nukleinsäure-Eichkurven

In diesem Zusammenhang erschien es uns interessant, einige Untersuchungen über die mengenmäßige Bestimmung von Nukleinsäuren vorzunehmen. Bei den beiden gängigen NA-Extraktionsmethoden nach FERGUSON und WOOL (1962) und SCHNEIDER (1945) werden die extrahierten Nukleinsäuren in 0,1 n NaOH bzw. in 5% Trichloressigsäure (TCE) gelöst. Wir stellten für beide Verfahren Eichkurven auf.

DNA-Bestimmung (DISCHE 1955, verbessert durch BURTON 1956)

1 ml der zu untersuchenden Lösung wird mit 2 ml Reagenzlösung versetzt, 17 h auf 30°C erwärmt und die optische Dichte bei 595 m μ im Spektralphotometer bestimmt. Die Kontrolle enthält 1 ml Lösungsmittel und 2 ml Reagenzlösung.

Reagenzlösung: 300 mg Diphenylamin (DPA) in 20 ml Eisessig + 0,3 ml conc. H₂SO₄ + 0,1 ml verd. Acetaldehyd (16 mg/ml)

RNA-Bestimmung (MEJBAUM 1939, modifiziert durch ALBAUM und UMBREIT 1947 und durch OGUR und ROSEN 1950)

1 ml der zu untersuchenden Lösung wird mit 1 ml Reagenzlösung 45 min gekocht (100°C, Rückflußkühler). Vor der Messung wird mit 2 ml H₂O auf 4 ml aufgefüllt; gemessen wird bei 660 m μ .

Reagenzlösung: Pro ml einer Lösung von 33 mg wasserfreiem FeCl₃ in 100 ml conc. HCl werden kurz vor Beginn der Messung 10 mg Orcin hinzugegeben.

Vorbereitung der Untersuchungslösungen

1. Verwendung des Lösungsmittels 0,1 n NaOH:

Die Nukleinsäuren werden 24 h bei 37°C inkubiert. Hierbei erfolgt Hydrolyse der RNA (SCHMIDT und THANNHAUSER 1945).

2. Verwendung von 5% TCE als Lösungsmittel:

Die Lösungen werden zur Hydrolyse der Nukleinsäuren (speziell der DNA) 15 min auf 90°C erhitzt (SCHNEIDER 1945).

Eichkurven

Es wurden Eichkurven aufgestellt für DNA (niedermolekular aus Hering, von der Firma FLUKA), RNA (purum, von FLUKA) und Gemische, die gleiche Mengen DNA und RNA enthielten. Es wurde geprüft, ob das Lösungsmittel Auswirkungen auf den Kurvenverlauf hat. Wir prüften auch die Nachweisbarkeit von DNA mit Orcin und von RNA mit DPA. Schließlich extrahierten wir aus Rattenleber nach FERGUSON und WOOL (1962) die DNA und RNA und stellten hierfür Eichkurven auf.

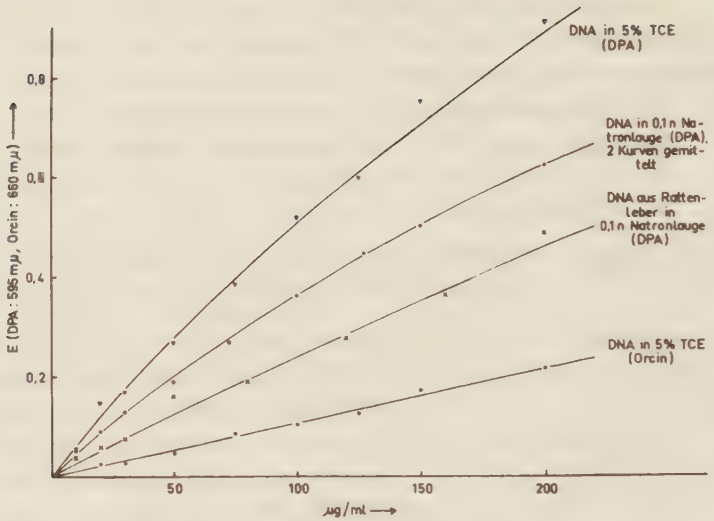


Abb. 4 DNA-Eichkurven

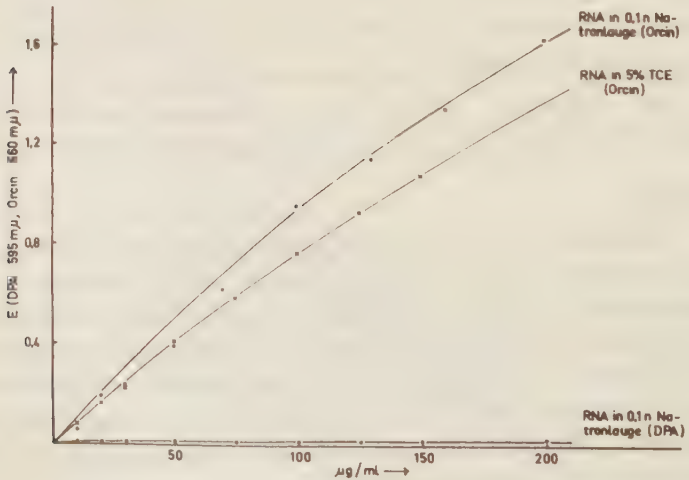


Abb. 5 RNA-Eichkurven

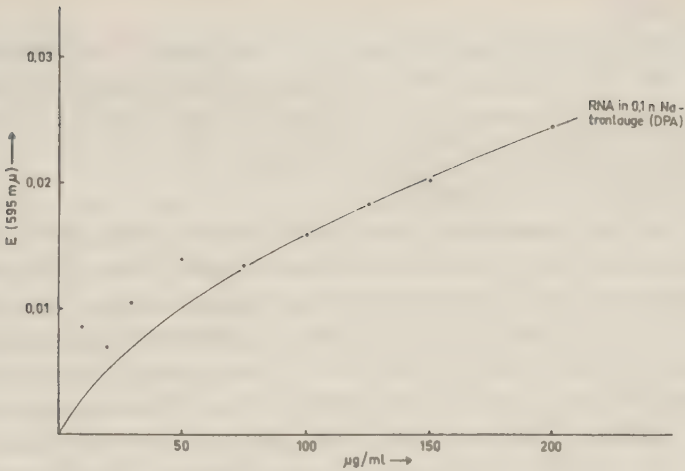


Abb. 6 RNA-Eichkurve (DPA), 50fach vergrößerter Ordina-
tenmaßstab

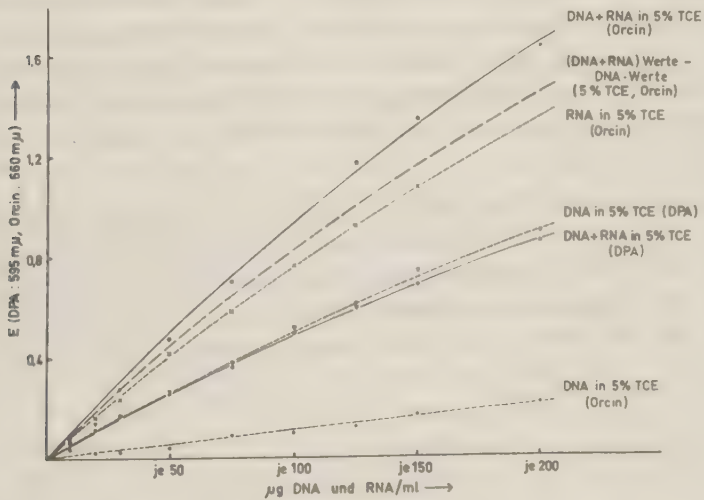


Abb. 7 Eichkurven für DNA/RNA-Gemische (gleiche Mengen),
zum Vergleich DNA- und RNA-Eichkurven (-----)
(--- = rechnerisch ermittelte Vergleichskurve)

Beobachtungen

1. Das Lösungsmittel spielt bei der Bestimmung von Nukleinsäuren für den Verlauf der Eichkurven eine wesentliche Rolle. So liegen die Meßwerte für DNA in TCE um etwa 45% höher als für DNA in NaOH (Abb. 4), für RNA in TCE um etwa 17% unter denen für RNA in NaOH (Abb. 5).
2. Beim Nachweis von DNA in TCE mit Orcin lagen die Meßwerte bei etwa 24% der mit DPA gewonnenen Werte (Abb. 4). Für RNA ergaben sich beim Nachweisversuch mit DPA sehr geringe Werte nahe dem Nullpunkt (Abb. 5). Bei 50facher Vergrößerung des Ordinatenmaßstabes zeigte sich jedoch, daß sich außer bei Werten bis zu 50 $\mu\text{g/ml}$ (Unterschreitung der Meßgenauigkeit) ein exakter Kurvenverlauf der Meßwerte darstellen läßt (Abb. 6). Wegen der Kleinheit der Werte muß damit gerechnet werden, daß hier Spuren von verunreinigender DNA erfaßt wurden.
3. Bei den Nukleinsäure-Gemischen verlief die Eichkurve bei DPA-Bestimmung nur unwesentlich unter der Kurve für reine DNA (Abb. 7). Beim Nachweis mit Orcin lagen die Meßwerte nach Abzug der Kurvenwerte, die sich für die im Gemisch enthaltene DNA ergeben, um etwa 7% über den Werten für reine RNA (Abb. 7).
4. Bei der Herstellung der Eichkurven für Ratten-Nukleinsäuren lagen die Meßwerte bei der DNA um ca. 27% niedriger als bei der aus Hering gewonnenen niedermolekularen DNA (Abb. 4). Bei der Ratten-RNA ergaben sich um ca. 55% niedrigere Werte als bei der käuflichen RNA, außerdem streuten sie erheblich.

c) Chromatographische Trennung von Thymin, Thymidin und seinen Nukleotiden

1. Dünnschichtchromatographie

Nach eingehendem Literaturstudium entschlossen wir uns, die einzelnen NA-Bausteine dünnschichtchromatographisch zu trennen und zwar auf der von RANDERATH (1961) empfohlenen ECTEOLA-Cellulose. Auf die üblicherweise durchgeführte Trennung der NA-Bausteine mit einer DOWEX I - Formiat - Säule (COHN 1955) wurde wegen der geringen Radioaktivitäts- und Substanzmengen (Vesikulardrüsen) zugunsten der Dünnschichtchromatographie verzichtet.

Dieses Verfahren versprach eine Reihe von Vorteilen gegenüber der Papierchromatographie. Man erhält kleinere Substanzflecke, das Chromatogramm hat eine wesentlich kürzere Laufzeit, und im Dünnschichtchromatogramm sind geringere Substanzmengen (10^{-2} μ Mol) nachweisbar (RANDERATH 1962). Celluloseschichten haben bei der Chromatographie von NA-Bausteinen gegenüber anorganischen Schichten den Vorteil, daß der Nachweis dieser Substanzen durch UV-Absorption besser möglich ist bzw. überhaupt erst ermöglicht wird, da bei anorganischen Schichten der Gipsgehalt stört (RANDERATH 1961). NA-Bausteine lassen sich am besten durch UV-Absorption nachweisen, und zwar absorbieren sie die Wellenlänge 254 m μ (PADR 1958, RANDERATH 1962). Andere Nachweisverfahren, wie die Farbreaktionen nach CHARGAFF et al. (1949), MICHL (1953) oder MAGASANIK et al. (1950) kommen nur für einzelne NA-Bausteingruppen in Frage.

Eine zweidimensionale Dünnschichtchromatographie wie bei KECK und HAGEN (1964) war für unsere Zwecke ungeeignet, da der Nachweis der radioaktiven Zonen auf den Dünnschichtplatten durch den Radiodünnschichtchromatographen sehr erschwert worden wäre.

ECTEOLA-Cellulose ist eine besonders modifizierte DEAE-Cellulose und nach RANDERATH (1961) standardisiert im Handel erhältlich. Die Standardisierung bezieht sich auf

eine definierte durchschnittliche Korngröße ($12 - 25 \mu$), mechanische Stabilität, spezielle Trennungseigenschaften und keine nennenswerte Absorption von kurzwelligem UV-Licht. Bei der DEAE-Cellulose ist ein Teil der Hydroxylgruppen durch Diäthylaminoäthylgruppen substituiert. Solche substituierten Cellulosen haben Anionenaustauscher-Eigenschaften.

Vorbereitung der Dünnschichtplatten

" 10 Gramm ECTEOLA-Cellulosepulver werden mit 60 bis 70 ml aqua dest. versetzt und 1 min intensiv geschüttelt. Die entstehende klumpen- und blasenfreie Suspension wird in üblicher Weise mit einem DESAGA-Streichgerät auf 20 x 20 cm großen Glasplatten ausgebreitet. Als Schichtdicke wählt man 0,25 mm. Die Suspension reicht je nach Streichgeschwindigkeit für 3-5 Platten. Die beschichteten Platten läßt man an einem staubfreien Ort über Nacht trocknen. " (Anweisung der Lieferfirma SERVA)

Laufmittel

RANDERATH (1961) empfiehlt als Laufmittel für NA-Bausteine auf ECTEOLA-Celluloseschichten verdünnte Säuren und Salzlösungen. Das Laufmittel 0,015 n HCl hat sich nach vielen Versuchen (RANDERATH hatte keine Desoxyriboside und entsprechende Phosphate chromatographiert) für die Trennung von thyminhaltigen Bausteinen als geeignet erwiesen (Abb. 8).

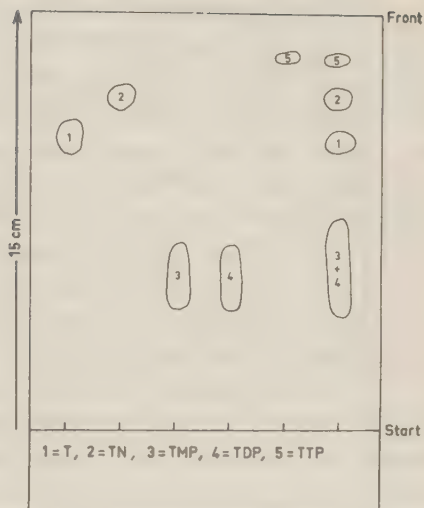
Thyminmonophosphat (TMP) und Thyminindiphosphat (TDP) fallen in der unteren Hälfte der Laufstrecke zusammen. Ihr Rf-Wert liegt bei ca. 0,37. In der oberen Hälfte folgen nacheinander Thymin (T) mit einem Rf-Wert von ca. 0,70, Thyminidin (TN) mit einem Rf-Wert von ca. 0,81 und Thyminidintriphosphat (TTP) mit einem Rf-Wert von ca. 0,90.

Geringere und größere Normalitäten von Salzsäure erwiesen sich als weniger geeignet. Es wurde eine schlechtere Trennung erzielt. Essigsäure, Äthanol/Ameisensäure-Gemische und Kochsalzlösungen verschiedener Molaritäten waren zur Trennung von Thyminderivaten völlig ungeeignet.

Abb. 8

Dünnschichtchromatogramm
auf ECTEOLA-Cellulose mit
Standards (T, TN, TMP,
TDP und TTP)

Laufmittel: 0,015 n HCl



Wie die Erfahrung zeigte, ist es erforderlich, die Platten vor Auftragen der Substanzen mit 0,05 n HCl vorzuchromatographieren, da sich sonst bei der eigentlichen Chromatographie im oberen Drittel der Platten eine oder mehrere fluoreszierende Fronten zeigen, welche die Substanzlokalisierung unmöglich machen. Hat die Lösungsmittelfront den oberen Rand der Platte erreicht, so wird diese unter der Heißluftdusche getrocknet.

Ablauf der Chromatographie

Die über Aktivkohle gereinigten, in Spitzkolben befindlichen Bausteinextrakte nahmen wir in einer geringen Menge (0,1 ml) 0,05 n HCl auf und trugen sie 3 cm vom unteren Rand der Dünnschichtplatte entfernt auf. Zugleich wurden auch die inaktiven Standards (T, TN, TMP, TDP, TTP), die im Verhältnis mg/ml in 0,05 n HCl gelöst waren, in Mengen von 10 µg bis 30 µg aufgetragen.

Da die Celluloseschicht gegenüber mechanischer Beanspruchung sehr empfindlich ist, trugen wir die Bausteinextrakte in einer möglichst geringen Menge 0,05 n HCl auf. Dabei darf die Spitze der Mikropipette die Schicht nur gerade eben berühren. Das Lösungsmittel wurde wegen der thermischen Empfindlichkeit der Nukleotide nicht unter Infrarot-Strahlung sondern im Stickstoffstrom von den Startflecken abgedampft. Trotz aller Vorsicht am Start in der Celluloseschicht entstandene "Löcher" wurden mit Cellulosepulver repariert.

In den üblichen Chromatographietanks chromatographierten wir mit 0,015 n HCl als Laufmittel über 15 cm und trockneten die Platten unter der Luftdusche.

Es zeigte sich, daß die Startflecke nur schwer vom Laufmittel benetzt wurden. Um Wanderungsverzerrungen zu vermeiden, ließen wir zunächst die Laufmittelfront bis an die Startlinie heransteigen, benetzten die Startflecke mit Laufmittel und führten dann erst die Chromatographie weiter fort.

Nachweis der Substanzen

Der einzige brauchbare Nachweis für NA-Bausteine besteht in ihrer UV-Absorption bei 254 m μ (PADR 1958, RANDERATH 1962). Mit einer geeigneten monochromatischen, kurzwelligen UV-Lampe, die fast ausschließlich die Wellenlänge 2536 Å emittiert, ist es möglich, die durch die NA-Bausteine bedingte Fluoreszenzlösung nachzuweisen. An den Stellen, an denen sich die NA-Bausteine im Chromatogramm befinden, treten dann im Gegensatz zu der leicht bläulichen Fluoreszenz der ECTEOLA-Dünnschichtplatte dunkelblaue Flecken auf. Die allgemein üblichen UV-Lampen emittieren vorwiegend die Wellenlänge 3660 Å und sind deshalb zur Substanzlokalisation ungeeignet.

Die Nachweisgrenze für Thyminderivate liegt relativ niedrig. Sie liegt nach eigener Erfahrung bei Thymin und Thymidin unterhalb von 10 μ g, für TMP, TDP und TTP bei etwa 15 μ g.

2. Papierchromatographie

Es zeigte sich in den Dünnschichtchromatogrammen, daß nach Entwicklung statt der zu erwartenden radioaktiven Substanzflecke eine mehr oder weniger ausgedehnte radioaktive Zone erschien, die unter einer normalen UV-Lampe stark fluoreszierte.

Hier liegt die Überlegung nahe, daß die NA-Bausteine an höhermolekulare Carrier-Substanzen gebunden sind. Eine Differenzierung der auf den Platten vorhandenen Radioaktivität in die einzelnen thyminhaltigen Bausteine war also so nicht möglich. Jedoch mußte unbedingt festgestellt werden, wieviel Prozent der an die stark fluoreszierenden Substanzen gebundenen radioaktiven Substanzen noch in der Pyrimidin-Ringform vorhanden ist, d.h. es mußte ausgeschlossen werden, daß es sich bei diesen radioaktiven Bezirken ausschließlich oder vorwiegend um Abbauprodukte des Thymin handelte.

Elution des Chromatogramms

Zu diesem Zwecke wurde aus dem Dünnschichtchromatogramm der radioaktive Bezirk eluiert. Wir kratzten die Cellulose aus und eluierten sie nacheinander zweimal mit aqua dest., einmal mit Methanol (je 5-6 ml, 10 min bei ca. 50°C). Die Eluate wurden vereinigt, eingedampft und in 2 ml aqua dest. aufgenommen. Von dieser Lösung wurde die Gesamtaktivität durch Entnahme von 2mal 5% im Flüssig-Szintillations-Spektrometer mit internem Standard bestimmt.

Hydrolyse und Chromatographie

Nun schloß sich eine Ameisensäurehydrolyse nach WYATT (1951) an.

Wir dampften wieder ein, lösten den Rückstand in 0,5 ml 98% HCOOH und überführten diese Lösung mit der Mikropipette in kleine PYREX-Bombenröhrchen ($\varnothing 1,2$ cm). Diese wurden zugeschmolzen und im Bombenofen eine Stunde lang auf 175°C erhitzt. Dabei wurden alle Bindungen an evtl. Carrier-Substanzen aufgespalten und aus TN, TMP, TDP und TTP hydrolytisch Thymin freigesetzt.

Die Bombenröhrchen wurden vorsichtig aufgeschlagen, die Ameisensäure im Stickstoffstrom abgedampft, der Rückstand in einer kleinen Menge 0,05 n HCl aufgenommen und auf WHATMAN I - Papier chromatographiert. Wir verwendeten dabei das von WYATT (1951) vorgeschlagene System: Isopropanol/2 n HCl (65:35).

In diesem System liegen TN, TMP und TDP etwa an gleicher Stelle, Thymin zusammen mit TTP deutlich davon getrennt (Abb. 9). Ein Probechromatogramm mit in oben erwähnter Weise hydrolysiertem Standardgemisch aus TN, TMP, TDP und TTP bewies die Vollständigkeit der Hydrolyse bei der obigen Methode.

Ist in dem zur Hydrolyse eingesetzten Gemisch noch Cellulose vorhanden, wie es bei unzureichender Abzentrifugierung des Cellulose-Sedimentes bei der vorangehenden Elution geschehen kann, so wird sie bei der Hydrolyse zu schwarzem Pigment (Kohlenstoff) umgewandelt. Bei der Chromatographie bleibt dieses Pigment am Start liegen und stört nicht.

Nachweis der Substanzen

Wie im Dünnschichtchromatogramm so ist auch im Papierchromatogramm der Nachweis durch Fluoreszenzlöschung bei 2536 Å prinzipiell möglich. Jedoch zeigte es sich, daß die Flecken nach Entwicklung der Chromatogramme nur sehr schwer zu lokalisieren waren. Wir fertigten deshalb Kontaktphotographien an, die die Lokalisation der Substanzflecke sehr schön und deutlich zeigten.

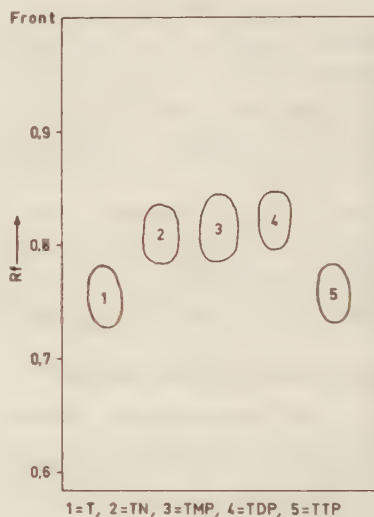


Abb. 9

Papierchromatogramm nach WYATT mit den Standards T, TN, TMP, TDP und TTP.

d) Radioaktivitätsbestimmungen

1. Radiodünnschichtchromatograph

Wir wiesen die nach Entwicklung der Dünnschichtchromatogramme auf den Platten befindlichen radioaktiven Zonen mit Hilfe eines Radiodünnschichtchromatographen nach. Dieser arbeitete nach dem Prinzip des Methandurchflußzählers.

Er bestand im wesentlichen aus Meßkopf, Transportvorrichtung, Verstärker und Registriergerät (Abb. 10). Die Dünnschichtplatte lag auf einer Fläche, die sich wahlweise mit einer Geschwindigkeit von 120 mm/h, 300 mm/h oder 600 mm/h unter dem Meßkopf fortbewegte. Der Meßkopf war fensterlos. Zwischen Zähldraht und Zählkammer lag eine Hochspannung von 3.100 Volt, die Zählkammer wurde kontinuierlich mit Methan durchströmt. Der 2 mm breite und 36 mm lange Spalt des Meßkopfes befand sich etwa 1 - 1,5 mm über der Dünnschichtplatte.

Die durch die β -Strahlung des ^{14}C -Zerfalls in der Zählkammer ausgelösten Entladungen wurden nach Verstärkung auf die Registriervorrichtung übertragen. Die Zahl der Entladungen wurde automatisch über eine Zeit (die sog. Dämpfung), die man wahlweise zwischen 0,1 und 300 sec einstellen konnte, integriert. Bei den Meßbereichen, die wir verwendeten, wählten wir für den Meßbereich 10^2 Imp/min eine Dämpfung von 60 sec, bei den Meßbereichen 3×10^2 Imp/min und 10^3 Imp/min eine Dämpfung von 30 sec. In der Registriervorrichtung zeichnete ein Schreiber die über diese Zeit integrierten Impulszahlen auf ein fortlaufendes Registrierpapier auf, dessen Geschwindigkeit mit der der Platten übereinstimmte. Die auf dem Registrierpapier erscheinende Kurve stellte somit ein getreues Abbild der auf der Dünnschichtplatte vorhandenen radioaktiven Zerfallsraten dar.

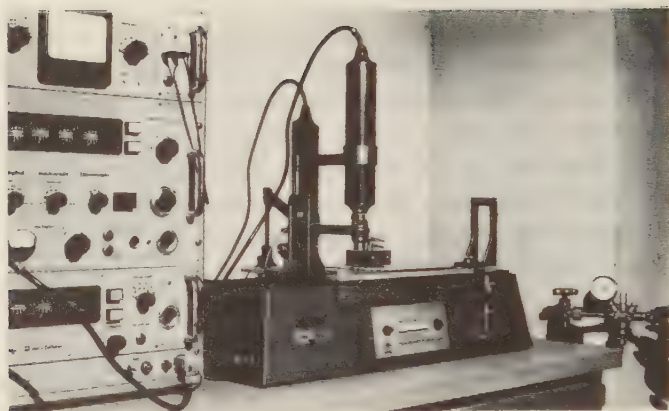


Abb. 10 Radiodünnschichtchromatograph

2. Radiopapierchromatograph

Zur Bestimmung der Radioaktivität auf den Papierchromatogrammen rüsteten wir den Radiodünnschichtchromatographen durch einige Veränderungen an der Meß- und Transportvorrichtung zum Radiopapierchromatographen um. Der etwa 35 mm breite Streifen des radioaktiven Papierchromatogramms wurde schwebend auf der Transportvorrichtung eingespannt. Oberhalb und unterhalb von ihm befand sich je ein Meßkopf, um eine möglichst hohe Ausbeute bei der Radioaktivitätsbestimmung zu erhalten (4π -Anordnung). Es wurde wieder fensterlos gemessen. Der Meßspalt war 4 mm breit und 35 mm lang. Der Chromatogramstreifen wurde zwischen den beiden Meßspalten, die den Streifen fast berührten, hindurchtransportiert. Die Messung und Registrierung der Impulsraten erfolgte auf die gleiche Weise wie beim Radiodünnschichtchromatographen.

3. Radioaktivitätsbestimmung im Flüssig-Szintillations-Spektrometer

Eines der wichtigsten Instrumente zur Bestimmung radioaktiver Impulsraten ist das Flüssig-Szintillations-Spektrometer.

Prinzip der Szintillationszählung

Das Prinzip der Szintillationszählung beruht auf der Tatsache, daß gewisse Substanzen, z.B. NaJ-Kristalle, durch die bei radioaktiven Zerfällen entstehende Strahlung zur Emission von Lichtquanten charakteristischer Wellenlänge angeregt werden. Die Anzahl der emittierten Lichtquanten ist dabei der Energie der auf die Szintillator-Moleküle einwirkenden β -Strahlung direkt proportional.

Szintillatorgemisch

In unserem Flüssig-Szintillations-Spektrometer (Tri-Carb-Counter, PACKARD) wurden als szintillierende Substanzen in Toluol gelöstes 2,5-Diphenyloxazol (PPO) und 1,4-bis-2-(4-Methyl-5-Phenyloxazolyl)-Benzol (Dimethyl-POPOP) eingesetzt. Da unsere Substanzen nur in Wasser löslich sind, setzten wir dem Szintillatorgemisch Äthanol zu. Es bestand aus einem Gemisch von 600 ml einer Lösung von 4 g PPO und 0,015 g Dimethyl-POPOP in 1.000 ml Toluol und 400 ml Äthanol. Dieses Gemisch nimmt bis zu 0,5 ml H_2O /10 ml auf.

Radioaktivitätsmessung

Die Substanz oder Lösung, deren Radioaktivität man bestimmen will, versetzt man mit einer bestimmten Menge Szintillatorgemisch (im allgemeinen 10 ml) und füllt diese Mischung in spezielle Glasgefäße, sog. Vials. Die von den (durch die β -Strahlung angeregten) Szintillator-Molekülen emittierten Lichtquanten durchdringen die Glaswand und werden von zwei Photomultipliern in einen Elektronenstrom umgewandelt, dessen Intensität dem Energiegehalt der radioaktiven Strahlung proportional ist. Die Messung erfolgt bei einer konstanten Temperatur nahe dem Gefrierpunkt.

Das Flüssig-Szintillations-Spektrometer ermöglicht durch spezielle Kanaleinstellungen das Erfassen spezifischer β -Energiebereiche. Der "Background" wird in erster Linie durch thermische Elektronen verursacht, jedoch durch eine Koinzidenzschaltung niedrig gehalten. Der durch Höhen- und Umgebungsstrahlung ausgelöste Backgroundanteil ist demgegenüber sehr gering.

Ausbeutebestimmung

Da nicht alle auftretenden ^{14}C -Zerfälle registriert werden, setzten wir zur Ausbeutebestimmung bei jeder Radioaktivitätsmessung zwei Parallelproben an. Hiervon wurde eine mit 1 ml eines Benzoessäure- ^{14}C -Standards bekannter Aktivität in Toluol versetzt, die andere mit 1 ml reinen Toluols. Ein Registriergerät druckte vollautomatisch nach Beendigung jeder Messung Probennummer, Meßzeit (vorher eingestellt) und Impulsrate ab.

4. SCHÖNIGER-Verbrennung

Das Prinzip der SCHÖNIGER-Verbrennung (SCHÖNIGER 1955) besteht in der Überführung der an eine feste Substanz gebundenen ^{14}C -Aktivität in gasförmiges CO_2 .

Die Verbrennung erfolgte in einem 500 ml-Glaskolben. Die radioaktive Substanz wurde in aschefreie Filterpapierschiffchen eingewogen, die in einem Platinnetz befestigt waren, das sich an einem Platindraht unter einem Glasstopfen befand. Der Verbrennungskolben wurde über Trockeneis tiefgekühlt und mit Sauerstoff gefüllt. Wie entzündeten das Papierschiffchen an einem dafür vorgesehenen Fortsatz und brachten es in die Sauerstoffatmosphäre ein. Dort erfolgte schnelle und restlose Verbrennung.

Der nun mit radioaktivem CO_2 gefüllte Kolben wurde wieder gekühlt, so daß ein Unterdruck in ihm entstand. Durch einen seitlichen Ansatzstutzen wurden nun 25 ml eines speziellen Szintillatorgemisches in den Kolben eingesogen. Dieses Szintillatorgemisch bestand aus 9 Teilen der schon erwähnten Toluol/Äthanol-Mischung und 1 Teil Äthanolamin zur Absorption des ra-

dioaktiven CO_2 . Der gut verschlossene Kolben wurde über Nacht in einer Schüttelmaschine geschüttelt. Am anderen Morgen war das CO_2 restlos von der Szintillatorlösung absorbiert und konnte im Flüssig-Szintillations-Spektrometer ausgemessen werden.

5. Bestimmung der Radioaktivität in der Gasphase (SIMON)

Das Prinzip der SIMON-Verbrennung (SIMON et al. 1959) besteht darin, daß die ^{14}C -markierte Substanz mit einem Oxydationsmittel in einem abgeschlossenen Glasröhrchen verbrannt und die Radioaktivität des entstehenden CO_2 nach manometrischer Messung der Menge in Gasphase bestimmt wird.

Verbrennungsvorgang

Etwa 5 mg der radioaktiven Trockensubstanz wurden mit KClO_4 und CuO als Oxydationsmittel in ein Porzellanschiffchen eingewogen. Dieses Porzellanschiffchen kam in ein Bombenröhrchen, das nach Evakuierung bis zu einem Vakuum von etwa 10^{-2} Torr zugeschmolzen wurde. Pro mg Substanz wurden 16 mg KClO_4 und 10 mg CuO eingesetzt. Das zugeschmolzene Bombenröhrchen wurde in einem Muffelofen 1 Stunde lang auf 640°C erhitzt. Bombenröhrchen, Porzellanschiffchen und CuO waren vorher ausgeglüht worden.

Messung der CO_2 -Menge

Nach dem Erhitzen befand sich im Bombenröhrchen sämtliche ^{14}C -Aktivität in Form von CO_2 . In einer speziellen Apparatur wurde nun (zur etwaigen Berechnung der ^{14}C -Aktivität pro mg Kohlenstoffgehalt der Probe) die Menge des entstandenen CO_2 bestimmt und quantitativ in ein Zählrohr überführt.

Diese Apparatur besteht aus 3 miteinander verbundenen Systemen, die getrennt evakuiert werden können (Abb. 11). Das Bombenröhrchen wurde in das erste System eingebracht, dieses evakuiert und sodann das Bombenröhrchen zertrümmert. Die Verbrennungsgase expandierten in das erste System.

In einer Kühlfalle mit einer Trockeneis/Äthanol - Kältemischung wurde das bei der Verbrennung entstandene H_2O ausgefroren. In einer zweiten Kühlfalle mit flüssigem N_2 wurde das radioaktive CO_2 ausgefroren. Diese zweite Kühlfalle wurde dann an das zweite evakuierte System angeschlossen, das CO_2 aufgetaut und in einem mit einem Manometer verbundenen besonderen Teil des zweiten Systems wieder eingefroren. Dieser Teil wurde vom allgemeinen System abgetrennt. Das CO_2 expandierte nach Auftauen in ein bekanntes Volumen und konnte im Manometer mengenmäßig bestimmt werden.



Abb. 11 SIMON-Apparatur zur Überführung von $^{14}\text{CO}_2$ ins Gasfüllzählrohr

Überführung des radioaktiven CO_2 ins Zählrohr

Der Manometerteil mit dem gasförmigen CO_2 wurde sodann mit dem dritten, schon evakuierten System verbunden. Dort wurde das CO_2 in einer weiteren Kühlfalle wieder ausgefroren. Es befand sich nun direkt vor dem an dieses dritte System angeschlossenen evakuierten Zählrohr. Die Kühlfalle wurde vom drit-

ten System abgetrennt, das CO_2 aufgetaut und mit Hilfe eines Methanstromes ins Zählrohr gedrückt. Wir ließen solange Methan nachströmen, bis der Druck im Zählrohr etwas über Atmosphärendruck lag. Nun trennten wir das Zählrohr vom dritten System ab.

Bestimmung der Radioaktivität

Das mit dem radioaktiven CO_2 und Methan gefüllte Zählrohr wurde frühestens 30 min nach Abnahme von der SIMON-Apparatur an ein Meßgerät angeschlossen. Diese Zeit ist erforderlich, um eine gute Durchmischung der beiden Gase herbeizuführen.

Bei den von uns verwendeten Zählrohren lag das Plateau der Charakteristik etwa zwischen 3.400 Volt und 4.200 Volt. Alle Messungen wurden daher bei einer Zählrohrspannung von 3.810 Volt durchgeführt. Die Zählrohrausbeuten lagen zwischen 63% und 66%.

Wir legten die Hochspannung von 3.810 Volt zwischen Zählendraht und Kapsel des Zählrohrs. Die durch die β -Zerfälle im Zählrohr verursachten Elektronenwolken führten durch Entladung zu Spannungsabfällen, die über eine Verstärkeranlage als Impulse registriert wurden.

Senkung des Backgrounds

Die Besonderheit der Meßanordnung war eine sog. Anti-Koinzidenz-Schaltung, durch die der Background niedrig gehalten wurde. Er betrug etwa 3 Imp/min.

Das Meßzählrohr war ringförmig von 3 Schirmzählrohren umgeben, die ganze Anordnung mit Blei abgeschirmt. Die im Meßzählrohr entstehenden β -Strahlen konnten die Zählrohrwand nicht durchdringen. Der Anteil der Umgebungs- und Höhenstrahlung, der trotz der Bleiabschirmung von außen eindrang, löste in der Regel vor der Registrierung im Meßzählrohr einen Impuls in einem der Schirmzählrohre aus. Impulse, die gleichzeitig im Meß- und im Schirmzählrohr auftraten, wurden unterdrückt.

Um vergleichbare Werte zu erhalten, haben wir die gemessenen Radioaktivitäten als Impulse pro Minute und pro mg Trokensubstanz ausgedrückt.

II. Ergebnisse

Die Untersuchungen wurden an den Organen Vesikular-
drüsen (im folgenden V genannt), Nieren (N) und Leber (L)
durchgeführt. Die Vesikulardrüsen, deren Gewicht unter dem
Einfluß von Testosteron stark ansteigt, stehen stellvertre-
tend für die sekundären Geschlechtsorgane. Wir bezogen die
Nieren in unsere Untersuchungen mit ein, weil sie entwick-
lungsgeschichtlich zu den Geschlechtsorganen in Beziehung
stehen und weil ihr Gewebe in größeren Gewichtsmengen ver-
fügbar ist. Als zentrales Stoffwechselorgan des Körpers gab
die Leber Anlaß, bei ihr den Einfluß von Testosteron auf
ihren Gehalt an Bausteinen zu untersuchen. Schließlich be-
zogen wir auch das Blut als Transportorgan in unsere Versu-
che mit ein.

Stellvertretend für alle DNA-Bausteine wählten wir
 ^{14}C -Thymidin, das wir den Tierkollektiven in eingangs be-
schriebener Weise injizierten. Das Thymidin bot sich hier
an, weil es bekanntlich als einziger der DNA-Bausteine für
diese charakteristisch ist und nicht für die RNA-Synthese
oder bei anderen Stoffwechselprozessen verwendet wird.

Als Versuchszeiten wählten wir 1 Stunde, 2 Stunden
und 3 Stunden von der Injektion des ^{14}C -Thymidin bis zur
Tötung der Tiere bzw. der Organentnahme. Man bekommt auf
diese Weise ein gutes Bild der Konzentrationsänderungen in
Abhängigkeit von der Zeit. Über 3 Stunden hinauszugehen er-
wies sich als nicht sinnvoll, weil nach 3 Stunden die Kon-
zentration an ^{14}C -Thymidin in der säurelöslichen Fraktion
bereits erheblich abgefallen war und bei den Vesikulardrü-
sen an der unteren Grenze der Meßbarkeit lag.

- a) Einfluß von Testosteron auf die Bausteinkonzentration im
Blut

Wir führten bei der Betrachtung dieser Fragestel-
lung zwei verschiedene Untersuchungen durch. Zunächst
bestimmten wir nach Gefriertrocknung des Blutes seine

^{14}C -Gesamtaktivität nach Injektion von ^{14}C -Thymidin. 1 Stunde nach Injektion ergab sich kein wesentlicher Unterschied an Radioaktivität. Im Blut der nicht mit Testosteron vorbehandelten Tiere lag sie bei 7,0 Ipm/mg Trockengewicht, bei den mit Testosteron vorbehandelten Tieren betrug sie 7,2 Ipm/mg Trockengewicht. Sodann nahmen wir in gleicher Weise wie bei den anderen Organen eine Perchlorsäureextraktion vor. Dabei ergaben sich folgende Resultate:

Tab. 1 ^{14}C -Aktivitäten in säurelöslicher Fraktion von Blut nach i.p. Injektion von (2- ^{14}C) Thymidin in 30 Tage alte männliche Ratten

Stunden	Zpm / g	
	Kontrollen	Testosteron-beh. Tiere
1	594	524
2	82	53

20 Tiere

Die Angaben beziehen sich jeweils auf 1 g Frischblut. Der Gehalt des Blutes an säurelöslicher Radioaktivität nimmt also im Verlauf des Experimentes sehr schnell ab. Aus dem Blut der vorbehandelten Tiere verschwindet sie schneller als das bei den unvorbehandelten Tieren der Fall ist.

Betrachten wir den Proteinrückstand nach Extraktion der säurelöslichen Fraktion, so erhalten wir folgendes Ergebnis:

Tab. 2 ^{14}C -Aktivitäten im Proteinrückstand des Blutes nach Extraktion der säurelöslichen Fraktion (siehe Tab. 1)

Stunden	Zpm / mg Trockengewicht	
	Kontrollen	Testosteron-beh. Tiere
1	5,5	4,7
2	5,1	6,2

20 Tiere

Wird aus dem Proteinrückstand noch die DNA extrahiert, so zeigt sich folgendes Bild:

Tab. 3 ^{14}C -Aktivitäten im Proteinrückstand des Blutes nach Extraktion der säurelöslichen Fraktion und der DNA (siehe Tab. 1 und Tab. 2)

Stunden	Zpm / mg Trockengewicht	
	Kontrollen	Testosteron-beh. Tiere
1	5,0	4,0
2	6,0	5,9

20 Tiere

Die Restaktivitäten im Blut nach Bausteinextraktion weisen keinen signifikanten Unterschied zwischen vorbehandelten und nicht vorbehandelten Tieren auf. Daran ändert auch die NA-Extraktion nichts. Eine Diskussion der kleinen Differenzen zwischen vorbehandelten und nicht vorbehandelten Tieren ist hier nicht angebracht, da wegen der Kleinheit der Impulsraten diese Differenzen verständlich sind.

b) Einfluß von Testosteron auf die Bausteinkonzentration in Leber und Nieren

In der Leber haben die extrahierten DNA-Bausteine folgende Radioaktivität (jeweils auf 1 g zur Extraktion eingesetztes Frischgewicht bezogen):

Tab. 4 ^{14}C -Aktivitäten in säurelöslicher Fraktion von Leber nach i.p. Injektion von (2 - ^{14}C) Thymidin in 30 Tage alte männliche Ratten

Stunden	Zpm / g Organ	
	Kontrollen	Testosteron-beh. Tiere
1	113	182
2	104	96
3	54	83

42 Tiere

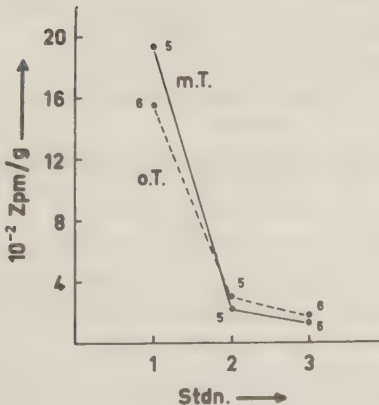
In der Leber ist die Konzentration an ^{14}C -Aktivität in der säurelöslichen Fraktion relativ niedrig verglichen mit den noch zu besprechenden Nieren und Vesikulardrüsen. Beachtenswert ist jedoch der Unterschied im Konzentrationsabfall bei den beiden Versuchsreihen.

In der Niere liegt die Bausteinkonzentration ungleich höher (Tabelle 5) als in der Leber.

Tab. 5 ^{14}C -Aktivitäten in säurelöslicher Fraktion von Niere nach i.p. Injektion von (2- ^{14}C) Thymidin in 30 Tage alte männliche Ratten

Stunden	Zpm / g Organ (Frischgewicht)	
	Kontrollen	Testosteron-beh. Tiere
1	1560	1940
2	302	226
3	180	134

33 Tiere



Beachtlich ist der äußerst schnelle Konzentrationsabfall in den Nieren der vorbehandelten Tiere von der 1. zur 2. Stunde. Von der 2. Stunde ab übersteigt die Bausteinkonzentration in den Nieren der unbehandelten Tiere die der vorbehandelten.

Abb. 12 Zeitliche Abhängigkeit der ^{14}C -Aktivitäten in säurelöslicher Fraktion der Niere (Zahlen an den Kurvenwerten bedeuten Anzahl der Tiere)

c) Einfluß von Testosteron auf die Bausteinkonzentration in den Vesikulardrüsen

Die Vesikulardrüsen stellen eines der Erfolgsorgane des Testosteron dar. Deshalb bieten sie in diesem Zusammenhang eines der interessantesten Untersuchungsobjekte. Die Konzentration an ^{14}C -Nukleinsäurebausteinen nach Injektion von ^{14}C -Thymidin ist in diesem Organ die weitaus höchste von denen der untersuchten Organgewebe (1 Stunde nach Injektion beträgt sie bei den Testosteron-behandelten Tieren ca. 1350 % der Konzentration in der säurelöslichen Fraktion des Blutes, bei den unbehandelten Tieren ca. 750 %). Dennoch ist die Bestimmung der Bausteinkonzentration hier wegen der geringen zur Verfügung stehenden Gewebemenge am schwierigsten. Wir gelangen hier sehr schnell an die untere Grenze der Meßgenauigkeit.

Bei der Radioaktivitätsbestimmung der Bausteine ergaben sich folgende Resultate:

Tab. 6 ^{14}C -Aktivitäten in säurelöslicher Fraktion von Vesikulardrüsen nach i.p. Injektion von (2- ^{14}C)Thymidin in 30 Tage alte männl. Ratten

Stunden	Zpm/100 mg Organ	
	Kontrollen	Testosteron-beh. Tiere
1	448	705
2	85	72
3	23	36

45 Tiere

Wegen unzureichender Meßgenauigkeit sind die 2 und 3 Stunden-Werte möglicherweise nicht signifikant.

Ein Diagramm veranschaulicht den Konzentrationsabfall (Abb. 13).

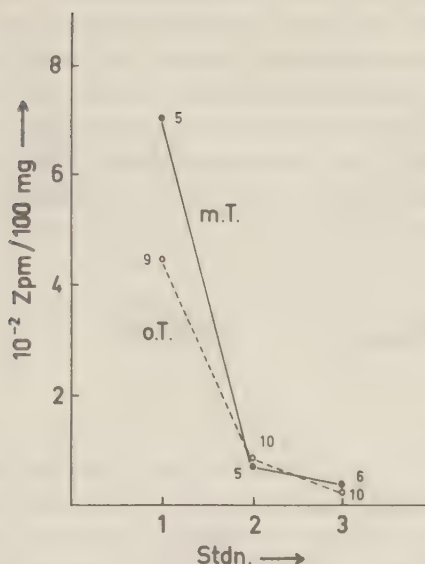


Abb. 13 Zeitliche Abhängigkeit der ^{14}C -Aktivitäten in säurelöslicher Fraktion der Vesikular-drüsen (Zahlen an den Kurvenwerten bedeuten Anzahl der Tiere)

d) Versuche zur Differenzierung der Bausteinzusammensetzung

Da die DNA-Synthese mit Hilfe der DNA-Polymerase aus den Basentrinukleotiden unter Abspaltung von Pyrophosphat erfolgt, muß das injizierte ^{14}C -Thymidin über das TMP und TDP zum TTP phosphoryliert werden. Zugleich ist auch der Abbau des Thymidin durch Desoxyribose-Abspaltung zum Thymin zu erwarten. Wir müßten also bei unseren Versuchen alle 5 Thyminderivate in radioaktiv markierter Form extrahieren können. Zur Differenzierung der einzelnen Thyminderivate setzten wir die Dünnschichtchromatographie auf ECTEOLA-Cellulose nach RANDERATH (1961) ein. Dabei ergab sich jedoch, daß der

radioaktive Bezirk bei allen Organextrakten an eine unter der UV-Lampe stark fluoreszierende Zone gebunden war, die je nach Organ einen verschieden hohen Rf-Wert aufwies. Mit der Position der inaktiven Standards deckte sie sich in keinem Falle, obwohl hierbei die Trennung der einzelnen Thymin-derivate gut gelang. Als Beispiele seien Radiodünnschichtchromatogramme von Nieren und Vesikulardrüsen angeführt (Abb. 14 und 15).

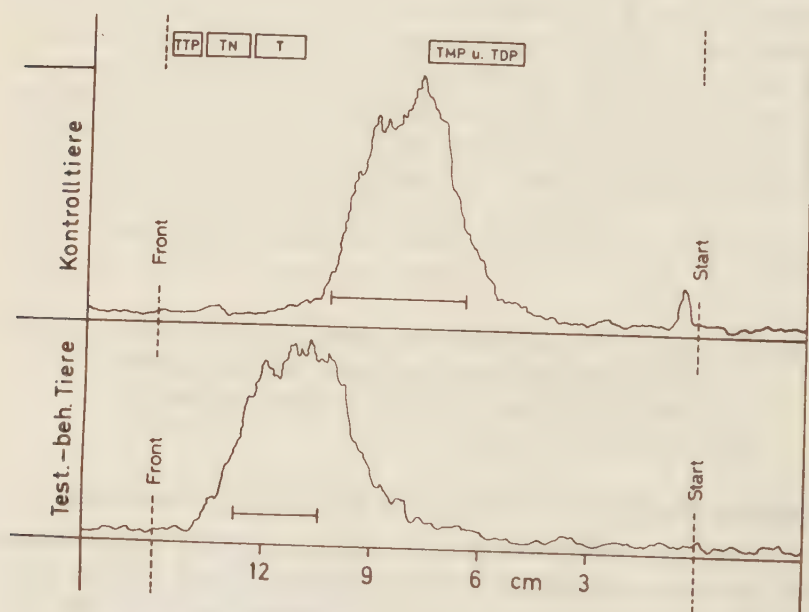


Abb. 14

Radiodünnschichtchromatogramme der säurelöslichen Fraktion der Nieren 1 Stunde nach Injektion von ^{14}C -Thyminid in 30 Tage alte männliche Ratten
 (—) = stark fluoreszierende Zone

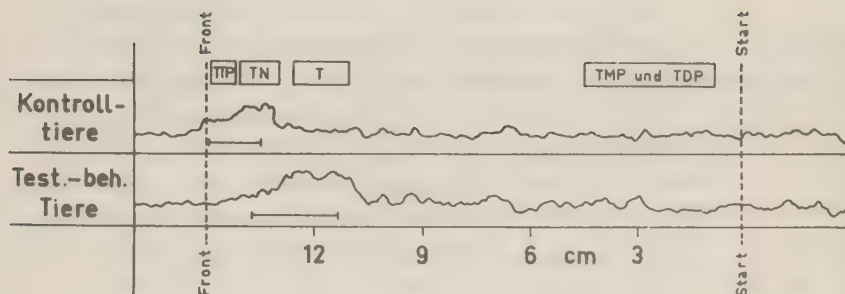


Abb. 15 Radiodünnschichtchromatogramme der säurelöslichen Fraktion der Vesikulardrüsen 1 Stunde nach Injektion von $(2 - ^{14}\text{C})$ Thymidin in 30 Tage alte männliche Ratten, (—) = stark fluoreszierende Zone

Bei diesen fluoreszierenden Substanzen, die die NA-Bausteine offensichtlich adsorptiv binden, handelt es sich wohl um Peptide; denn Perchlorsäureextrakte aus organischem Material sind proteinfrei.

e) Analyse der hydrolysierten Bausteine

Da eine gezielte Aufspaltung der Peptid-Baustein-Bindungen nicht möglich ist, mußten wir uns darauf beschränken, nachzuweisen, daß die Radioaktivität der Bausteinextrakte noch im Thymin-Ringsystem vorhanden ist, daß es sich also bei den extrahierten radioaktiven Verbindungen nicht etwa um Abbauprodukte des Thymin handelt. Diesen Nachweis führten wir mit Hilfe der Ameisensäure-Hydrolyse der aus dem Dünnschichtchromatogramm eluierten radioaktiven Zonen. An-

schließlich an die Hydrolyse nahmen wir die papierchromatographische Auftrennung des Hydrolysates nach WYATT (1951) vor.

Dabei zeigte es sich, daß bei den Nieren (Abb. 16) sämtliche auf dem Chromatogramm vorhandene Radioaktivität an Thymin gebunden war. Es handelt sich also bei den mit Perchlorsäure extrahierten radioaktiven Substanzen ausschließlich um Thyminderivate, nicht aber um Abbauprodukte des Thymin. Bei Vesikulardrüsen und Leber konnten wir wegen der Kleinheit der Impulsraten diesen Nachweis nicht erbringen.

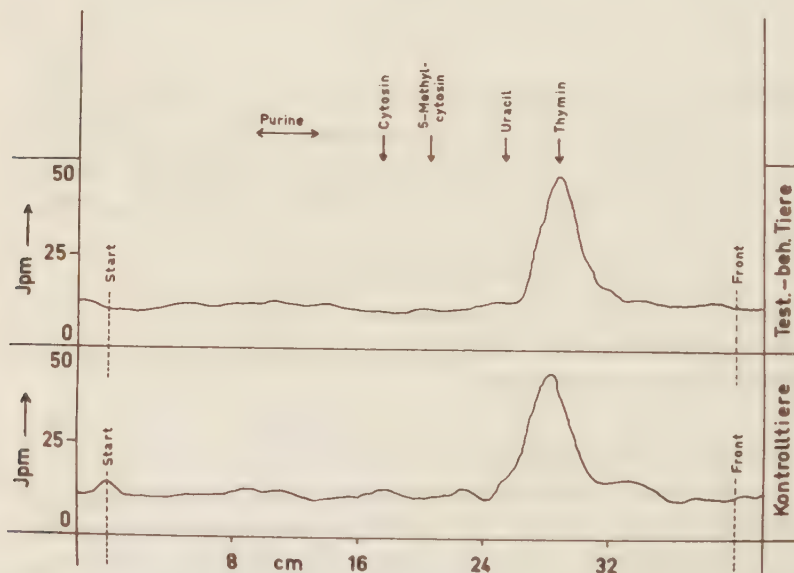


Abb. 16 Radiopapierchromatogramme der mit Ameisensäure hydrolysierten säurelöslichen Fraktion der Nieren 1 Stunde nach Injektion von $(2-^{14}\text{C})$ Thymin in 30 Tage alte männliche Ratten

f) Vergleich der Radioaktivitätsmengen in säurelöslicher Fraktion und in Proteinbindung

1. Leber

Bei der Bestimmung der Radioaktivität des Proteinrückstandes und der Restaktivität nach NA-Extraktion erhielten wir folgende Werte:

Tabelle 7

^{14}C -Aktivitäten im Proteinrückstand der Leber vor und nach NA-Extraktion verglichen mit den ^{14}C -Aktivitäten in säurelöslicher Fraktion

Im Protein- rückstand	Stunden	Kontrollen			Test.-beh. Tiere		
	1 2	Zpm / mg Proteintrockengewicht					
		vor NA-Extraktion	nach NA-Extraktion	NA	vor NA-Extraktion	nach NA-Extraktion	NA
		116	74	42	115	67	48
	2	94	48	46	92	31	61
In säure- lösl. Fr.	1 2	Zpm / g Frischgewicht					
		113			182		
		104			96		

26 Tiere

Da 1 g Frischgewebe etwa 230 mg Trockengewicht ergeben, folgt daraus, daß jeweils nur etwa 0,4% - 0,7% der Radioaktivität im Organ auf die säurelösliche Fraktion entfallen. Der erhebliche Rückgang der nicht extrahierbaren Restaktivitäten von der 1. zur 2. Stunde dürfte den bereits erfolgten Abtransport bzw. die schon fortgeschrittene Ausscheidung widerspiegeln. Die Werte für die in Nukleinsäuren enthaltenen Radioaktivitäten wurden in den Tabellen 7 und 8 durch Differenzbildung gewonnen und sind auf mg Trockengewicht von zur Extraktion eingesetzter Substanz bezogen.

2. Nieren

Bei den Nieren ergibt sich ein etwas anderes Bild:

Tabelle 8

^{14}C -Aktivitäten im Proteinrückstand der Niere vor und nach NA-Extraktion verglichen mit den ^{14}C -Aktivitäten in säurelöslicher Fraktion

Im Protein- rückstand	Stunden	Kontrollen			Test.-beh. Tiere		
	1 2	Zpm / mg Proteintrockengewicht					
		vor NA-Extraktion	nach NA	NA	vor NA-Extraktion	nach NA	NA
		152	60	92	136	46	90
		164	79	85	135	42	93
In säure- lösl. Fr.		Zpm / g Frischgewicht					
	1	1560			1940		
	2	302			226		

21 Tiere

Da die Nieren einen höheren Wassergehalt aufweisen als die Leber, entsprechen hier 1 g Frischgewicht etwa 190 mg Trockengewicht. Auf die säurelösliche Fraktion entfallen 1 Stunde nach Injektion von ^{14}C -Thymidin etwa 5-7%, nach 2 Stunden nur noch etwa 0,9% der Gesamtaktivität des Organs.

3. Vesikulardrüsen

Die Gesamtaktivität des Proteinrückstandes vor NA-Extraktion betrug 3 Stunden nach Injektion von ^{14}C -Thymidin in den Vesikulardrüsen der Testosteron-behandelten Tiere 439 Zpm pro mg Trockengewicht gegenüber 261 Zpm pro mg bei den Kontrolltieren.

Bei einer Zellfraktionierung 3 Stunden nach Injektion von ^{14}C -Thymidin betrug die Radioaktivität im Kern der Vesikulardrüsen (ohne NA-Extraktion) bei den vorbehandelten Tieren

1156 Zpm/mg Trockengewicht, bei den Kontrolltieren hingegen nur 703 Zpm/mg. Hierin spiegelt sich in etwa das Verhältnis der Radioaktivitäten bezogen auf das Trockengewicht der Gesamtzellen wieder.

An Restaktivitäten nach Baustein- und NA-Extraktion waren an den Proteinen der Vesikulardrüsen noch vorhanden:

Tab. 9 ^{14}C -Aktivitäten im Proteinrückstand der Vesikulardrüsen nach Extraktion der säurelöslichen Fraktion und der Nukleinsäuren

Stunden	Zpm / mg Trockengewicht	
	Kontrollen	Testosteron-beh. Tiere
1	24	47
2	18	28

29 Tiere

Bei der Radioaktivitätsbestimmung der extrahierten Nukleinsäuren ergaben sich folgende Werte, bezogen auf mg zur Extraktion eingesetzter Trockensubstanz:

Tab. 10 ^{14}C -Aktivitäten der extrahierten Nukleinsäuren aus Vesikulardrüsen 30 Tage alter männlicher Ratten nach i.p. Injektion von (2- ^{14}C)Thymidin

Stunden	Zpm / mg Trockengewicht	
	Kontrollen	Testosteron-beh. Tiere
1	65	138
2	72	104

29 Tiere

Hierbei können jedoch die Nukleinsäuren durch den Trocknungsprozeß schon denaturiert sein, so daß die Radioaktivitätsangaben zu niedrig sind. Über dieses Phänomen der Einbausteigerung von Vorstufen in die DNA unter dem Einfluß von Testosteron

ist von MOSEBACH und ENGELS (1966) bereits eingehend berichtet worden.

g) Relationen zwischen säurelöslicher, DNA-gebundener und proteingebundener Radioaktivität

Um uns über das Verhältnis der Radioaktivitäten in den einzelnen Fraktionen ein genaues Bild machen zu können, setzten wir die Gesamtaktivitäten der Organe gleich 100 und drückten die Teilaktivitäten der Fraktionen in prozentualen Angaben aus. So hat man auch die Möglichkeit, Vergleiche zwischen den untersuchten Organen anzustellen.

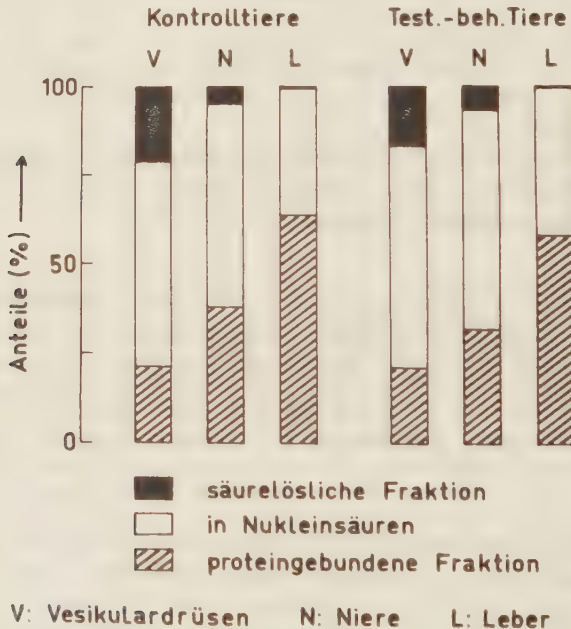


Abb. 17 Radioaktivitätsanteile 1 Stunde nach ^{14}C -Thymidininjektion in 30 Tage alte männliche Ratten

Hierbei sieht man, wie fortschreitend von Erfolgsorgan über ein entwicklungsgeschichtlich den Erfolgsorganen verwandtes Gewebe bis zum Nicht-Erfolgsorgan der prozentuale Anteil der säurelöslichen Fraktion abnimmt, der Anteil der protein-gebundenen Fraktion hingegen zunimmt. Weiterhin kommt der Einfluß des Testosteron zum Ausdruck, der zugunsten der NA den Anteil der beiden anderen Fraktionen absinken läßt.

Beim Vergleich der Anteile der einzelnen Fraktionen bei den verschiedenen Versuchszeiten ergibt sich folgendes Bild (Abb. 18):

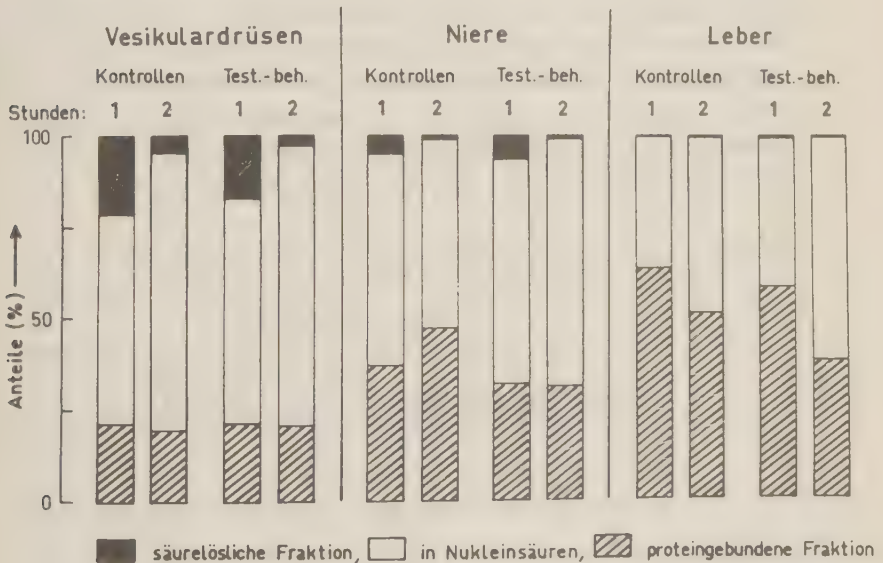


Abb. 18 Radioaktivitätsanteile nach Injektion von ^{14}C -Thymidin in 30 Tage alte männliche Ratten

Es ist ersichtlich, daß bei den Vesikulardrüsen die Steigerung des Nukleinsäureanteils von der 1. zur 2. Stunde auf Kosten der säurelöslichen Fraktion geht. Auch bei Leber und Nieren zeigt sich eine relative Anteilserhöhung der Nukleinsäuren.

h) Vergleich der nicht an Nukleinsäuren gebundenen Radioaktivitäten

Bei unseren Versuchen ergaben sich bekanntlich zwei Fraktionen, in denen nicht NA-gebundene Radioaktivität vorhanden ist. Wir haben bei der Niere nachgewiesen, daß die säurelösliche Fraktion ausschließlich aus zur DNA-Synthese verwertbaren Bausteinen besteht. Aufgrund der schnellen Konzentrationsabnahme der proteingebundenen, nicht extrahierbaren Restaktivität, speziell bei den Vesikulardrüsen mit ihrem großen Bausteinbedarf, vermuten wir, daß es sich bei dieser proteingebundenen Radioaktivität ebenfalls zum größten Teil um für die DNA-Synthese verwendbare Bausteine handelt. Deshalb erschien es uns gerechtfertigt, einmal die Summen der nicht an Nukleinsäuren gebundenen Radioaktivität (pro mg Frischgewicht) zu betrachten (Tab. 11).

Tab. 11 Nicht DNA-gebundene ^{14}C -Aktivitäten nach i.p. Injektion von (2- ^{14}C)Thymidin in 30 Tage alte männliche Ratten

Organ	Stunden	Zpm / 100 mg Organ	
		Kontrollen	Test.-beh. Tiere
V	1	892 (9)	1575 (5)
	2	419 (10)	590 (5)
N	1	1295 (6)	1067 (5)
	2	1530 (5)	819 (5)
L	1	1710 (7)	1557 (6)
	2	1113 (8)	724 (5)

V: Vesikulardrüsen N: Niere L: Leber
Zahl der Tiere in Klammern

Während in den Vesikulardrüsen die gleiche Entwicklung wie in der Leber zu beobachten ist, nämlich ein zeitlicher Abfall der nicht an Nukleinsäuren gebundenen Radioaktivität, steigt bei den Nieren diese Radioaktivität bei den Kontrolltieren von der 1. zur 2. Stunde an. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß die Aktivitätssummen der vorbehandelten Tiere bei den Vesikulardrüsen über denen der Kontrolltiere liegen, während es bei Nieren und Leber genau umgekehrt ist.

III. Diskussion

Unsere Versuche haben ergeben, daß der Einbau von ^{14}C -Thymidin in die DNA der Vesikulardrüsen unter Testosteroneinfluß gesteigert wird, der Einbau in die DNA von Nieren und Leber hingegen nicht wesentlich beeinflusst wird. In allen 3 Organen jedoch ist eine Stunde nach ^{14}C -Thymidininjektion die ^{14}C -Aktivität in der säurelöslichen Fraktion bei Testosteron-behandelten Tieren größer als bei den Kontrolltieren. Nach 2 und 3 Stunden nimmt die Radioaktivität in den säurelöslichen Fraktionen erheblich ab, als Ausdruck für die Herabsetzung der Konzentration der verfügbaren radioaktiven DNA-Bausteine durch Einbau in die DNA der Erfolgsorgane, Abbau und Ausscheidung. Die Erhöhung der ^{14}C -Aktivität in der säurelöslichen Fraktion, die 1 Stunde nach ^{14}C -Thymidingabe vorhanden ist, wird nach 2 und 3 Stunden teilweise zur Hemmung. Das könnte darauf zurückzuführen sein, daß bei den Kontrollen durch weniger starken Einbau in die DNA der Erfolgsorgane ein relativer Überschuß an ^{14}C -Bausteinen entsteht. Bei Nieren und Leber erfolgt der Einbau von ^{14}C -Bausteinen in die DNA fast ausschließlich während der 1. Stunde nach ^{14}C -Thymidingabe, also in der Zeit einer sehr hohen Bausteinkonzentration. Nach 2 und 3 Stunden ist kaum noch ein weiterer Einbau festzustellen.

Die proteingebundenen ^{14}C -Aktivitäten in den Nieren sind bei den vorbehandelten Tieren deutlich geringer als bei den Kontrollen. Sie zeigen sich relativ zeitunabhängig. Bei der Leber dagegen sind sie bei vorbehandelten und nicht vorbehandelten Tieren nahezu gleich, nehmen aber mit der Zeit ab. Der hohe Anteil, den in den untersuchten Organen die proteingebundenen Aktivitäten an den Gesamtaktivitäten einnehmen, der fehlende Einbau in die DNA von Nieren und Leber nach der ersten Stunde und die Abnahme der proteingebundenen Aktivitäten in der Leber als zentralem Stoffwechselorgan des Organismus nach der zweiten Stunde

lassen vermuten, daß es sich bei den ^{14}C -Aktivitäten in Proteinbindung zum Teil um sehr fest gebundene, nicht utilisierbare Thyminderivate handelt, zum Teil aber auch um Abbauprodukte, die schließlich ausgeschieden werden oder im Intermediärstoffwechsel Verwendung finden. In der säurelöslichen Fraktion finden sich bei den Nieren nach unseren Feststellungen keine Abbauprodukte, vielmehr erschien nach Hydrolyse alle ^{14}C -Aktivität in Form von Thymin.

Die ^{14}C -Aktivität in Proteinbindung war bei den Vesikulardrüsen nach Testosteronvorbehandlung höher als bei den Kontrollen. Sie hatte sowohl bei den Testosteron-behandelten Tieren als auch bei den Kontrollen nach 2 Stunden stark abgenommen. Hierbei blieb das Verhältnis der Radioaktivitäten erhalten. Das verleitet uns zu dem Schluß, daß in diesem Erfolgsorgan laufend Bausteine der proteingebundenen Fraktion in die säurelösliche überführt, sie also auf diese Weise verfügbar gemacht werden.

Da die nach 1 Stunde unter Testosteronvorbehandlung zu beobachtende Erhöhung der ^{14}C -Aktivität in der säurelöslichen Fraktion nur in den Vesikulardrüsen auch zu einem vermehrten Einbau in die DNA führte, wollen wir uns bei den folgenden Überlegungen über mögliche Permeabilitätsveränderungen von Membranen unter dem Einfluß von Testosteron auf dieses Organ beschränken.

Man muß sich darüber klar sein, daß die Konzentrationen an radioaktiven Bausteinen, die wir bei unseren Versuchen erzielten, sozusagen Momentaufnahmen der Verwendung des injizierten radioaktiven Materials darstellen, über die absolute Konzentration an Bausteinen (radioaktiv + inaktiv) jedoch keine Auskunft geben können. Dieses wäre nur dann möglich, wenn wir jedes Bausteinmolekül radioaktiv markieren könnten. Es ist leicht zu verstehen, daß eine derartige Versuchsanordnung, selbst wenn sie möglich wäre, unsere Frage nach der absoluten Bausteinkonzentration nicht beantworten könnte, da die radioaktiv markierten Substanzen, die zur Bausteinsynthese dienen

können, ihre Radioaktivität auch an viele andere Bestandteile der Zelle abgeben. Wir müssen also davon ausgehen, daß uns die absolute Bausteinkonzentration im Gewebe unbekannt ist.

Um zu einer Interpretation unserer Versuchsergebnisse zu gelangen, erweist es sich als zweckmäßig, alle nur möglichen sinnvollen Modelle durchzudiskutieren. Es gibt 9 mögliche Grundmodelle (Abb. 19), je nach der Konzentration von Gesamt-Thyminderivaten und ^{14}C -Thyminderivaten.

			Konzentration an ^{14}C -Thyminderivaten	
Konzentration an Gesamt-Thyminderivaten	1.	2.	3.	erhöht
	4.	5.	6.	gleich
	7.	8.	9.	vermindert
	erhöht			
		gleich		
			vermindert	

Abb. 19 Schema zur Veranschaulichung der 9 möglichen Grundmodelle für den Einfluß eines Wirkstoffes auf die Konzentration von radioaktiven DNA-Bausteinen (Zahlen bedeuten 1., 2. usw. Modell)

Wir gehen bei unseren Betrachtungen davon aus, daß die DNA-Synthese bei den mit Testosteron vorbehandelten Tieren gegenüber den Kontrolltieren erhöht ist und daß keine Austauschreaktionen (im Sinne Schönheimers) vorliegen (MOSEBACH und ENGELS 1966).

Der Einbau von radioaktiv markierten Vorstufen in die DNA ist also erhöht. Für die gleichzeitige Erhöhung der Konzentration an freien ^{14}C -Thyminderivaten kommen nur 3 Modelle der Abbildung 19 infrage:

1. Modell: Hier kann die Syntheserate des Thyminrings in der Zelle je nach Grad der Erhöhung der Gesamtbausteinkonzentration entweder erhöht, gleich oder vermindert sein. Da die Konzentration an ^{14}C -Thyminderivaten einen Ausdruck für die Transportkapazität der Zellmembran für DNA-Bausteine darstellt, ist diese Transportkapazität bzw. die Permeabilität der Zellmembran bei diesem Modell erhöht.

2. Modell: Hier ist die Ringsyntheserate vermindert, die Membranpermeabilität erhöht.

3. Modell: Hier liegen die gleichen Verhältnisse vor wie beim 2. Modell; die Ringsyntheserate ist noch stärker vermindert.

Den anderen 6 Modellen liegen verschiedene Veränderungen der Ringsyntheserate zugrunde; diese im einzelnen zu diskutieren würde hier zu weit führen, da keines dieser Modelle unseren Versuchsergebnissen gerecht wird.

Unsere Modelle beruhen auf der Annahme, daß in den Zellen der Vesikulardrüsen tatsächlich Bausteine (Thymin-Ringsysteme) synthetisiert werden. Selbst wenn jedoch alle zur DNA-Synthese verwendeten Bausteine mit dem Blutstrom durch die Zellmembran in die Zelle hinein transportiert würden, könnte das auf das Phänomen des erwiesenen Anstiegs der Membranpermeabilität nur einen positiven Einfluß haben. Bei Erhöhung der Einbaurate kann sogar bei Erniedrigung der Konzentration an ^{14}C -Thyminderivaten eine Steigerung der Zellmembranpermeabilität vorliegen.

Bei den ersten 3 Modellen, die unseren Versuchsergebnissen gerecht werden können, ist die Interpretation bei erhöhter und bei gleicher Einbaurate gleich, sie kann jedoch bei einigen der 6 anderen Modelle durchaus verschieden sein. Daher haben wir bei unseren Modellen die Konzentrationsänderungen auf gleichen Einbau normiert; d.h. die angegebenen Konzentrationsänderungen sollen auch dann vorliegen, wenn die Einbaurate nicht erhöht wäre.

Die Einbausteigerung hat wohl eine Bedeutung für die Höhe der absoluten Bausteinkonzentration in säurelöslicher Fraktion, stört jedoch die Diskussion nicht, da ja die Konzentration an ^{14}C -Thyminderivaten trotz gesteigerten Einbaus erhöht ist. Eine Verminderung der Einbaurate unter Testosteroneinfluß ist bei den Vesikulardrüsen nicht zu beobachten und braucht daher nicht diskutiert zu werden.

Eine weitere Voraussetzung für die Diskussion besagt, daß die Konzentration an ^{14}C -Thyminderivaten im Blut bei den vorbehandelten Tieren nahezu gleich bzw. leicht erniedrigt ist und unter der Konzentration im Vesikulardrüsengewebe liegt; dieses haben wir experimentell bestätigt. Andernfalls wäre die Konzentrationserhöhung im Vesikulardrüsengewebe auch ohne eine Erhöhung der aktiven Membranpermeabilität durch einen rein passiven Konzentrationsausgleich zwischen Blut und Organgewebe erklärbar.

Wir haben festgestellt, daß die DNA-Bausteine sowohl im Blut als auch in den Organzellen an makromolekulare Substanzen gebunden sind. Ob die Zellmembran für diese makromolekularen Substanzen durchlässig ist oder ob die DNA-Bausteine vor dem Transport durch die Membran von den makromolekularen Substanzen abdissoziieren, spielt für die Interpretation ebenfalls keine Rolle. Nur wenn die Bindefähigkeit der makromolekularen Substanzen für DNA-Bausteine in der Zelle größer wäre als im Blut und durch die Testosteroneinwirkung noch weiter erhöht würde, muß die Bindefähigkeit der erwähnten Substanzen bei der Interpretation mit berücksichtigt werden.

Da die Konzentration an ^{14}C -Thyminderivaten in der Zelle ein Maß für den Transport von DNA-Bausteinen aus dem Blut in die Zellen der Vesikulardrüsen darstellt, ist also ersichtlich, daß der Transport von Bausteinen durch die Zellmembran unter Testosteroneinfluß zunimmt. Wir müssen auch annehmen, daß die Zellmembran eine aktive Transportfunktion hat, da das Phänomen der Konzentrationszunahme an ^{14}C -Thyminderivaten durch einen reinen Konzentrationsausgleich zwischen intrazellulärem und extrazellulärem bzw. intravasalem Raum nicht erklärbar ist. Ob diese Zunahme der Zellmembranpermeabilität eine primäre Wirkung des Testosteron darstellt oder ob es sich dabei um einen vom Kern ausgehenden Prozeß handelt, kann nicht geklärt werden. Es wäre auch denkbar, daß eine derartige Permeabilitätserhöhung unter dem Einfluß von freigesetzten Gewebshormonen zustande käme. In diesem Falle mußte man eine Wechselwirkung zwischen Steroidhormonen und Gewebshormonen annehmen, wie sie durch SPAZIA-NI und SZEGO (1958) bei Östrogenen gezeigt wurde.

An dieser Stelle sind noch weitere Möglichkeiten des Testosteroneinflusses zu diskutieren. Es gibt in der Zelle für die erhöhte DNA-Synthese im wesentlichen 4 mögliche Angriffspunkte des Testosteron. Davon fallen die ersten 3 unter den Begriff der Enzymaktivierung oder -induktion.

1. Angriffspunkt:

Aktivitätssteigerung der DNA-Polymerase

2. Angriffspunkt:

Aktivitätssteigerung der Enzyme, die zu einer Steigerung der Bausteinphosphorylierung führen, die also mittelbare (Basen, Nukleoside, Monophosphate, Diphosphate) in unmittelbare (Triphosphate) Bausteine umwandeln

3. Angriffspunkt:

Aktivitätssteigerung der Enzyme, die zur vermehrten Synthese von DNA-Bausteinen in der Zelle führen

4. Angriffspunkt:

Steigerung der Zellmembranpermeabilität für DNA-Bausteine

Nehmen wir nun an, daß nur die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante der DNA-Polymerase erhöht wäre, so würde dieser Vorgang allein ohne eine erhöhte Nachlieferung von Bausteinen sehr schnell zu einer Verarmung der Zelle an DNA-Bausteinen führen. Wenn nur die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die Enzyme, die mittelbare in unmittelbare Bausteine umwandeln, erhöht wäre, so würde die Einbausteigerung ohne Nachlieferung von mittelbaren Bausteinen ebenfalls sehr schnell zum Stillstand kommen.

Läge nur eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die Enzyme der Bausteinsynthese vor, so könnte allein dieser Vorgang die Einbausteigerung unterhalten. Ohne eine Erhöhung der Permeabilität der Zellmembran für Bausteine aus dem Extrazellularraum würde dabei allerdings eine Verminderung der spezifischen Aktivität in der Bausteinfraktion auftreten. Demgegenüber könnte eine Erhöhung der Permeabilität der Zellmembran für DNA-Bausteine ohne eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten von Enzymen allein wegen der dadurch bedingten Steigerung der Bausteinkonzentration zu einer Einbausteigerung in die DNA führen.

Aus diesen Ausführungen ist ersichtlich, daß allein ein erhöhtes Bausteinangebot, ob durch Synthese in der Zelle oder durch Einstrom aus dem Blut, eine Steigerung der DNA-Synthese bewirken und unterhalten könnte. Eine alleinige Aktivitätssteigerung der DNA-Polymerase oder der an der Herstellung von unmittelbaren DNA-Bausteinen beteiligten Enzyme könnte eine Einbausteigerung wohl auslösen, aber nicht fortführen. Ob die Enzyme der Bausteinsynthese aktiviert werden, ist bei unseren Versuchen nicht feststellbar. Sicher ist, daß die Zellmembranpermeabilität für DNA-Bausteine in Vesikulardrüsen unter dem Einfluß von Testosteron gesteigert wird.

Diese Permeabilitätssteigerung kann einmal durch vermehrte Ausnutzung einer schon vorhandenen Permeabilität erfolgen, weiterhin durch Eröffnung neuer Transportkapazitäten und schließlich noch durch erhöhte Affinität von DNA-Bausteinen zu Acceptor- oder Carriermolekülen in der Zelle.

Zusammenfassung

Es hatte sich herausgestellt, daß unter dem Einfluß von Testosteron der Einbau von ^{14}C -Thymidin in die DNA der Vesikulardrüsen unreifer Ratten erheblich ansteigt (MOSEBACH und ENGELS 1966). Um zu erfahren, ob diese Einbauförderung auf eine Aktivitätssteigerung der Enzyme, die im Kern die DNA-Synthese katalysieren, oder auf ein erhöhtes Angebot an Bausteinen, also letztlich auf eine Erhöhung der Zellmembranpermeabilität für diese Bausteine, zurückzuführen ist, wurde der Einfluß des Testosteron auf die Konzentration an Vorstufen (2- ^{14}C)Thymidin in den Vesikulardrüsen (vergleichsweise Leber, Niere und Blut) 30 Tage alter männlicher Ratten studiert.

Die Aufnahme von ^{14}C -Aktivität in die säurelösliche und die proteingebundene Fraktion dieses Organs wurde nach 5-tägiger Testosteronvorbehandlung 1 Stunde nach Injektion von ^{14}C -Thymidin um etwa 60% gegenüber den Kontrollen gesteigert. Diese Steigerung war aufgrund des schnellen Verbrauchs der radioaktiven Vorstufen nach 2 und 3 Stunden nicht mehr eindeutig nachweisbar, da das "steady-state" der Bausteine in der säurelöslichen Fraktion dann von den Konzentrationen an radioaktiven Bausteinen nicht mehr repräsentiert werden konnte. Die Ergebnisse mit Leber, Niere und Blut zeigten zum Teil gegensätzliches Verhalten. Bei der Niere traten beispielsweise von der 2. Stunde ab kleine Hemmungen des Einbaus ein.

Beim Versuch einer Trennung von Thymin, Thymidin und den Thymidinphosphaten durch Dünnschichtchromatographie auf ECTEO-LA-Cellulose, die bei den Standards gut gelang, zeigte sich bei allen Organen nur eine einzelne radioaktive Zone, deren R_f -Wert mit keinem der erwähnten Substanzen übereinstimmte. Die Tatsache, daß bei Trennung der thyminhaltigen Bausteine nur diese eine radioaktive Zone entstand, führen wir auf Adsorption an eine noch unbekannte makromolekulare Substanz zurück. Nach Hydrolyse der radioaktiven Zone in 98% HCOOH bei 175°C im Bombenrohr (1 h) wurde der Rückstand in Isopropanol/2n HCl (65:35) auf WHATMAN I-Papier chromatographiert. Dabei zeigte sich lediglich Thymin.

Weiterhin stellte sich heraus, daß die Verhältnisse der Anteile an DNA-gebundener, säurelöslicher und proteingebundener Radioaktivität weitgehend organspezifisch sind und auch durch Testosteronbehandlung nicht wesentlich beeinflußt werden. Mit zunehmender Androgenität der Organe nimmt hierbei der protein-gebundene Anteil ab, der säurelösliche, sozusagen der für die DNA-Synthese verfügbare, zu.

Die Steigerung der Konzentration an ^{14}C -Thymin-haltigen Bausteinen unter dem Einfluß von Testosteron führt zu dem Schluß, daß die Wirkungen des Testosteron sich nicht auf die Zellkerne der Vesikulardrüsen beschränken. Vielmehr müssen wir annehmen, daß ein Einfluß auf die Zellmembranpermeabilität stattfindet, entweder unmittelbar oder mittelbar über einen Einfluß vom Kern her.

Literatur

- ALBAUM, H.G. und UMBREIT, W.W. J. Biol. Chem. 167, 369 (1947)
- ALLFREY, V. In BRACHET und MIRSKY: The Cell, Bd. I, S. 193. Academic Press New York (1959)
- ALLFREY, V.G., LITTAU, V.C. und MIRSKY, A.E. Proc. N.A.S. 49, 414 (1963)
- BANGHAM, A.D., STANDISH, M.M. und WEISSMANN, G. J. Mol. Biol. 13, 253 (1965)
- BREUER, H. In KARLSON: Mechanisms of Hormone Action, S. 6. Thieme-Verlag Stuttgart (1965)
- BURTON, K. Biochem. J. 62, 315 (1956)
- CHARGAFF, E., FISCHER, E., DONIGER, G., GREEN, G., und MISANI, F. J. Biol. Chem. 177, 405 (1949)
- CLEVER, U. In KARLSON: Mechanisms of Hormone Action, S. 142. Thieme-Verlag Stuttgart (1965)
- COHN, W.E. In CHARGAFF und DAVIDSON: The Nucleic Acids, Bd. I, S. 211. Academic Press New York (1955)
- DAHNKE, H.-G., MOSEBACH, K.-O. und DIRSCHERL, W. Acta endocrin. 57, 441 (1968)
- DAHNKE, H.-G. und MOSEBACH, K.-O. 15. Jahrestagung der Deutschen Endokrin. Ges. Köln, 7.3.1969
- DE WEER, P. und CRABBE', J. Biochim. Biophys. Acta 155, 280 (1968)
- DIRSCHERL, W. und HAUPTMANN, K.H. Ber. ges. Physiol. u. exp. Pharma. 136, 140 (1949)
- DIRSCHERL, W. 2. Symposion der Deutschen Ges. f. Endokrinologie 1954, S. 21. Springer-Verlag Berlin (1954)
- DIRSCHERL, W. 5. Colloquium der Ges. für physiol. Chemie 1954, S. 162. Springer-Verlag Berlin (1955a)
- DIRSCHERL, W. Ergebn. Phys. 48, 112 (1955b)
- DISCHE, Z. In CHARGAFF und DAVIDSON: The Nucleic Acids, Bd. I, S. 285. Academic Press New York (1955)
- DREWS, J. und WACKER, A. Zum Wirkungsmechanismus der Steroidhormone (1967)

- ENGEL, L.L. und SCOTT, J.F. Rec. Progr. Horm. Res. XVI, 79 (1960)
- EPIFANOVA, O.I. Excerpta Medica No. 111, S. 324 (Second Intern. Congress on Hormonal Steroids, Mailand, 22. - 28.5.1966)
- FAHMY, A.R., GRIFFITHS, K. MEHLER, R. und WILLIAMS, A.R. Biochem. J. 105, 6C (1967)
- FEIGELSON, M., GROSS, P.R. und FEIGELSON, P. Biochim. Biophys. Acta 55, 495 (1962)
- FERGUSON, L.A. und WOOL, J.G. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 110, 529 (1962)
- FUJII, T. und VILLEE, C. Proc. N.A.S. 57, 1468 (1967)
- FUJII, T. und VILLEE, C.A. Endocrinology 82, 463 (1968)
- GORSKI, J. und MUELLER, G.C. Arch. Biochem. Biophys. 102, 21 (1963)
- GORSKI, J. und NELSON, N.J. Arch. Biochem. Biophys. 110, 284 (1965)
- GREENMAN, D.L., WICKS, W.D. und KENNEY, F.T. J. Biol. Chem. 240, 4420 (1965)
- HAMILTON, T.H. Proc. N.A.S. 51, 83 (1964)
- HAYNES, R.C., SUTHERLAND, E.W. und RALL, T.W. Rec. Progr. Horm. Res. XVI, 121 (1960)
- HECHTER, O. In KARLSON: Mechanisms of Hormone Action, S. 61. Thieme-Verlag Stuttgart (1965)
- HECHTER, O., YOSHINAGA, K., HALKERSTON, I.D.K. und BIRCHALL, K. Arch. Biochem. Biophys. 122, 449 (1967)
- HECKMANN, K. In KARLSON: Mechanisms of Hormone Action, S. 41. Thieme-Verlag Stuttgart (1965)
- HOLTEN, D.D. und KENNEY, F.T. J. Biol. Chem. 242, 4372 (1967)
- ICHII, S., FORCHIELLI, E. und DORFMAN, R.I. Steroids 2, 631 (1963)
- JACOB, F. und MONOD, J. J. Mol. Biol. 3, 318 (1961)
- JEFFERSON, L.S., EXTAN, J.H., BUTCHER, R.W., SUTHERLAND, E.W. und PARK, C.R. J. Biol. Chem. 243, 1031 (1968)
- KARLSON, P. Mechanisms of Hormone Action, S. 139. Thieme-Verlag Stuttgart (1965)

- KARLSON, P. und SEKERIS, C.E. Acta endocrin. 53, 505 (1966a)
- KARLSON, P. und SEKERIS, C.E. Rec. Progr. Horm. Res. XXII, 473 (1966b)
- KASSENSAAR, A., KOUWENHOVEN, A. und QUERIDO, A. Acta endocrin. 39, 223 (1962)
- KECK, K. und HAGEN, U. Biochim. Biophys. Acta 87, 685 (1964)
- KENNEY, F.T. und KULL, F.J. Proc. N.A.S. 50, 493 (1963)
- KOCHAKIAN, C.D. Vitamins and Hormones IV, 255 (1946)
- KOCHAKIAN, C.D. und HARRISON, D.G. Endocrinology 70, 99 (1962)
- KOCHAKIAN, C.D. In KARLSON: Mechanisms of Hormone Action, S. 192. Thieme-Verlag Stuttgart (1965)
- KOCHAKIAN, C.D. und HILL, J. Biochemistry 5, 1696 (1966)
- KNOX, E. und AUERBACH, V.H. J. Biol. Chem. 214, 307 (1955)
- LANG, N., HERRLICH, P. und SEKERIS, C.E. Acta endocrin. 57, 33 (1968)
- LIAO, S., BARTON, R.W. und LIN, A.H. Proc. N.A.S. 55, 1593 (1966)
- LIAO, S. und LIN, A.H. Proc. N.A.S. 57, 379 (1967)
- LIPPERT, U., MOSEBACH, K.-O. und KRAMPITZ, G. Nature 214, 917 (1967)
- MAGASANIK, B., VISCHER, E. DONIGER, R., ELSA, D. und CHARGAFF, E. J. Biol. Chem. 186, 37 (1950)
- MANGAN, F.R., NEAL, G.E. und WILLIAMS, D.C. Fourth Meeting of FEBS, Abstr. 445, 3.-7.7.1967 Oslo
- MARSH, J.M. und SAVARD, K. Steroids 8, 133 (1966)
- MARSH, J.M., BUTCHER, R.W., SAVARD, K. und SUTHERLAND, E.W. J. Biol. Chem. 241, 5436 (1966)
- MEANS, A.R. und HAMILTON, T.H. Proc. N.A.S. 56, 686 (1966)
- MEJBAUM, W. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chemie 258, 117 (1939)
- MERCIER, C. Excerpta Medica No. 111, S.269, 2nd I.C.H.S. Mailand (1966)
- MICHL, H. Naturwissenschaften 40, 390 (1953)
- MOORE, R.J. und HAMILTON, T.H. Proc. N.A.S. 52, 439 (1964)

- MOSEBACH, K.-O. und DIRSCHERL, W. Acta endocrin. 47, 51 (1964)
- MOSEBACH, K.-O. und ENGELS, T. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chemie 345, 111 (1966)
- MOSEBACH, K.-O., JÄGER, E. und SCHROETER, M. Frühjahrstagung der Ges. für Biol. Chemie Tübingen (1967a)
- MOSEBACH, K.-O., KÜLFMANN, W.R. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chemie 348, 9 (1967b)
- MOSEBACH, K.-O. 13. Symposion der Deutschen Ges. für Endokrin. Würzburg 1967, Springer-Verlag Berlin, S. 17 (1968)
- MUELLER, G.C. In KARLSON: Mechanisms of Hormone Action, S.228. Thieme-Verlag Stuttgart (1965)
- NILSSON, O. Excerpta Medica No. 111, Abstr. 352, 2nd I.C.H.S. Mailand (1966)
- OGUR, M. und ROSEN, G. Arch. Biochem. Biophys. 25, 262 (1950)
- PADR, Z. In HAIS und MACEK: Handbuch der Papierchromatographie, Bd. I, S.525. Verlag Gustav Fischer Jena (1958)
- PASTAN, I., HERRING, B. und FIELD, J.B. J. Biol. Chem. 236, PC 25 (1961)
- PASTAN, I., HERRING, B. JOHNSON, P. und FIELD, J.B. J. Biol. Chem. 237, 287 (1962)
- PECHAN, I. und MARKO, P. Chem. Abstracts 60, 5961f (1964); Biologia 18, 377 (1963)
- PELLEGRINO, C. und POLLERA, M. Experientia 23, 134 (1967)
- RANDERATH, K. Angew. Chemie 73, 674 (1961)
- RANDERATH, K. Dünnschichtchromatographie, Verlag Chemie, Weinheim S. 183 (1962)
- RITTER, C. und PADDLE, B. Biochim. Biophys. Acta 143, 547 (1967)
- SANDLER, R. und HALL, P.F. Endocrinology 79, 647 (1966)
- SCHMIDT, G. und THANNHAUSER, S.J. J. Biol. Chem. 161 (1945), 83
- SCHNEIDER, W.C. J. Biol. Chem. 161 (1945), 293
- SCHÖNIGER, W. Mikrochimica Acta (Wien), 1, 123 (1955)
- verbessert durch:
 KELLY, R.C., PEETS, E.A.,
 GORDONS, S. und BUYSKE, O.A. Anal. Biochem. 2, 267 (1961)

- SEKERIS, C.E. und LANG, N. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chemie 340, 92 (1965)
- SIMON, H., DANIELS, H. und KLEBE, K. Angew. Chemie 71, 303 (1959)
- SPAZIANI, E. und SZEGO, C.M. Endocrinology 63, 669 (1958)
- SUTHERLAND, E.W. Pharmakol. Rev. 12, 265 (1960)
- SUTHERLAND, E.W., ØYE, I. und BUTCHER, R.W. Rec. Progr. Horm. Res. XXI, 623 (1965)
- TALALAY, P., HURLOCK, B. und WILLIAMS-ASHMAN, H. Proc. N.A.S. 44, 842 (1958)
- TSUBOI, K.K. und PRICE, T.D. Arch. Biochem. Biophys. 81, 223 (1959)
- UNHJEM, O., ATTRAMADAL, A. und SOLNA, J. Acta endocrin. 58, 227 (1968)
- VERMEULEN, A. und VERDONCK, L. Steroids 11, 609 (1968)
- VILLEE, C.A. und FUJII, T. Excerpta Medica No. 111, S. 156, 2nd I.C.H.S. Mailand (1966)
- WICKS, W.D., GREENMAN, D.L. und KENNEY, F.T. J. Biol. Chem. 240, 4414 (1965)
- WICKS, W.D. Science 160, 997 (1968)
- WYATT, G.R. Biochem. J. 48, 584 (1951)
- YIELDING, K.L. und TOMKINS, G.M. Proc. N.A.S. 46, 1483 (1960)

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

- Å = Ångström
- ACTH = Adrenocorticotropes Hormon
- AMP = Adenosinmonophosphat
- 3',5'-AMP = zyklisches Adenosinmonophosphat
- ADP = Adenosindiphosphat
- ATP = Adenosintriphosphat
- DNA = Desoxyribonukleinsäure (-acid)
- DPA = Diphenylamin
- FSH = Follikel-stimulierendes Hormon
- GDH = Glutamatdehydrogenase
- HCG = Human-Choriongonadotropin
- Ipm = Impulse pro Minute
- L = Leber

μC	= Mikro-Curie
N	= Niere
NA	= Nukleinsäure (-acid)
NADH	= reduziertes Nicotinamid-adenin-dinukleotid
NADP	= Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
PPO	= 2,5-Diphenyloxazol
POPOP (Dimethyl-POPOP)	= 1,4-bis-2-(4-Methyl-5-Phenyl-oxazolyl)-Benzol
RNA	= Ribonukleinsäure (-acid)
T	= Thymin
TCE	= Trichloressigsäure
TDP	= Thymidindiphosphat
TMP	= Thymidinmonophosphat
TN	= Thymidin
TSH	= Thyreotropes Hormon
TTP	= Thymidintriphosphat
U	= Uracil
U/min	= Umdrehungen pro Minute
UDP	= Uridindiphosphat
UDPAG	= UDP-Acetylglucosamin
UDPG	= UDP-Glucose
UMP	= Uridinmonophosphat
UN	= Uridin
UTP	= Uridintriphosphat
V	= Vesikulardrüse
WKF	= Eigenname der Gerätefirma
Zpm	= Zerfälle pro Minute

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor
Dr. rer. nat. Karl-Oskar M o s e b a c h
für die Überlassung des Themas und die ein-
gehende wissenschaftliche Beratung herzlich
danken.

LEBENS LAUF

Am 6. August 1944 wurde ich, Wolfgang Hengstebeck, als Sohn des Essener Rechtsanwalts Dr. Alfred Hengstebeck und seiner Ehefrau Friedel, geb. Pohl, in Olpe geboren.

Mein Vater kam in der Nacht vom 13. zum 14. Februar 1945 beim Bombenangriff auf Dresden zu Tode. Seit 1950 ist meine Mutter als Justizangestellte beim Amtsgericht Essen tätig.

Nach 3 - jährigem Besuch der Volksschule kam ich Ostern 1954 auf das Staatliche Burggymnasium Essen, das ich am 6. März 1963 mit dem Zeugnis der Reife verlassen habe.

Im Sommersemester 1963 begann ich an der Rhein. Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn ein Medizinstudium. Bis zum Sommersemester 1966 blieb ich in Bonn, studierte dann vom 12. September 1966 bis zum 22. März 1967 an der Medical School der Universität Oxford und kehrte danach an die Universität Bonn zurück, wo ich am 31. Januar 1969 die ärztliche Prüfung bestanden habe.

